



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Biología reproductiva de cangrejos tricodactílicos del Río Paraná Medio

Senkman, Lidia Eloisa

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Lopretto, Estela C.

Co-dirección: Collins, Pablo A.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2014

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140506001347>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

Resumen

A pesar de su abundancia e importancia en la cuenca del Plata, la biología reproductiva de los cangrejos tricodactílicos prácticamente no ha sido estudiada hasta el momento. Por esta razón, esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo abordar dicha temática desde aspectos morfológicos, histológicos, comportamentales y fisiológicos en tres especies de la familia Trichodactylidae. Los muestreos se realizaron mensualmente durante 24 meses en distintos puntos de la provincia de Santa Fe, de los cuales se obtuvieron todos los individuos utilizados.

Los análisis macroscópicos e histológicos de las gónadas se realizaron en *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei*, los ensayos comportamentales de cortejo, cópula, comportamiento agonístico y cuidado materno en *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *Trichodactylus borellianus* y el ensayo fisiológico de consumo de oxígeno bajo condiciones de laboratorio en *T. borellianus*. Los diferentes análisis se efectuaron en una, dos o las tres especies de acuerdo con la disponibilidad de individuos en el ambiente. En el caso del análisis de consumo de oxígeno, el tamaño de *Z. collastinensis* y *D. pagei* y el estrés de estas hembras impidieron mantenerlas ovígeras para realizar los ensayos correspondientes. El sistema reproductivo de *Z. collastinensis* y *D. pagei* resultó similar en ambas especies y sigue el patrón general propuesto para los decápodos, mostrando características distintivas en ambas especies. Los machos tienen una estructura pareada con diferenciación estructural y de tonalidad. El sistema se divide en testículo y vaso deferente, que es reconocible en machos sexualmente reproductivos por su coloración blanquecina. También presentan una estructura en el extremo posterior del vaso deferente de color naranja traslúcido en *Z. collastinensis* y transparente-blancuzco en *D. pagei*. En estadios inmaduros, suele observarse sólo el testículo, siendo el vaso deferente transparente (por la ausencia de espermatozoides en su interior). La talla (ancho de cefalotórax = ACF) observable (sólo testículo) es de 23,71-24,41 mm y de 28,01-28,69 mm en *Z. collastinensis* y *D. pagei*, respectivamente. La estructura microscópica del sistema reproductor masculino presenta en el testículo túbulos seminíferos agrupados en lóbulos y delimitados por células accesorias. Dentro de cada lóbulo las células germinales se encuentran en la misma etapa de desarrollo, observándose dentro de los túbulos seminíferos espermatogonias, espermatoцитos primarios



y secundarios, espermátidas y espermatozoides de acuerdo con el grado de madurez del macho. Los túbulos seminíferos del testículo se comunican con el vaso deferente anterior por un corto conducto colector. En el vaso deferente anterior los espermatozoides se agrupan formando un conglomerado de espermatozoides que luego es encapsulado en el vaso deferente medio (VDM) formando los espermatóforos, los que se observan en su luz. El vaso deferente presenta una zona anterior lindante al VDM formado por células columnares secretoras y su extremo posterior desprovisto de espermatozoides pero sí abundante fluido seminal, que se propone como reservorio de fluido en la inseminación. La presencia tanto del vaso deferente con coloración blanquecina como su estructura distal grasa, evidencia la madurez morfo-fisiológica del macho por la acumulación de esperma. Las hembras presentan un ovario único con forma de “U” invertida y ubicación dorso-central en el interior del cefalotórax, con receptáculos seminales que presentan unión oviductual dorsal. El ovario es visible en tallas (ACF = ancho de cefalotórax) de 10,50-11,70 mm en *Z. collastinensis* y entre 17,55-21,22 mm en *D. pagei*, observándose luego con una tonalidad blanco-perlada. Al alcanzar entre 19,30-22,22 mm en *Z. collastinensis* y 21,05-25,13 mm en *D. pagei*, el ovario se observa de un tono nacarado-rosado claro. La estructura microscópica del ovario, tanto en hembras maduras como inmaduras, presenta una microestructura similar en toda su forma. La pared ovárica tiene dos capas, una germinal interna y otra externa de tejido conectivo. En hembras inmaduras presenta una distribución homogénea de oocitos en previtelogénesis y vitelogénesis endógena, y *germarium* de ubicación central. En cambio los cangrejos maduros de ambas especies presentan diferentes tipos de células, tales como oogonias, oocitos en distinto desarrollo y células foliculares. Tanto la estructura del vaso deferente distal como la forma de la gónada en forma de “U” invertida son características propias de las dos especies estudiadas, que marcan una diferencia con el resto de los cangrejos dulciacuícolas consignados hasta ahora. Los comportamientos agonísticos observados en *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* fueron similares, observándose antes, durante y después de las cópulas y entre machos adultos. Durante el cortejo y cópula se observó la presencia de comportamiento agonístico, teniendo un patrón general unidireccional -de los machos a las hembras en las tres especies- con el fin de mantener el control del evento reproductivo. El cortejo de *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus*



resultó corto y agresivo. El cortejo consiste en una serie de movimientos donde el macho identifica a la hembra, se acerca y la toma de uno o varios pereiópodos. Al producirse el encuentro, las hembras de *D. pagei* realizan movimientos erráticos con los pereiópodos hasta el acoplamiento, posiblemente asociados a la movilización de la estructura del gonoporo. Las cópulas observadas -tanto en el laboratorio como en el ambiente natural- se realizaron con el cefalotórax “en duro”. En las tres especies se observó una participación pasiva por parte de la hembra, adoptando una ubicación inferior respecto al macho sin retención de la hembra luego de la transferencia del material genético. En *Z. collastinensis* y *D. pagei* se observaron cópulas estacionales, mientras que en *T. borellianus* ocurrieron durante todo el año. Los cuidados parentales en *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus* fueron observados sobre los huevos y crías, variando su tiempo en relación con la especie y siendo proporcional el tiempo de incubación y el de cuidado parental luego de la eclosión. Inmediatamente después de depositados los huevos en su abdomen, las hembras de *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus* se ubicaron fuera del agua (rocas, cuevas o vegetación de acuerdo a los hábitos de cada especie) donde el agua no cubra el abdomen. Este comportamiento podría deberse a la necesidad de evitar el “lavado” del agua sobre la masa de huevos. El tiempo de incubación en condiciones de laboratorio fue entre 37-41 días en *Z. collastinensis*, 46-62 días en *D. pagei* y 8-12 días en *T. borellianus*. Durante el período de incubación se registró cuidado materno en forma de ventilación y limpieza de la masa de huevos. Se identificaron tres tipos de movimientos de los pleópodos: movimiento lateral, sube-baja y oblicuo, todos con el fin de movilizar la masa de huevos y la consecuente entrada de agua oxigenada al abdomen. Luego de la eclosión, los pequeños cangrejos se mantuvieron bajo el abdomen materno durante un período de 30 ± 3 días en *Z. collastinensis*, 34 ± 4 días en *D. pagei* y 10 ± 2 días en *T. borellianus*. Los tiempos tanto de incubación como de cuidado materno diferentes entre las especies, evidencian la estrategia de *T. borellianus* a “invertir” su energía de forma repartida en varios eventos reproductivos a diferencia de *Z. collastinensis* y *D. pagei*, que solo presentan una puesta anual de huevos. La fecundidad fue de 1.143 ± 345 huevos en *Z. collastinensis*, 662 ± 117 huevos en *D. pagei* y 83 ± 68 huevos en *T. borellianus*. La fertilidad (número de crías vivas por hembra) fue de 651 ± 172 en *Z. collastinensis*, 582 ± 8 en *D. pagei* y 63 ± 33 en *T. borellianus*. Las tasas de consumo (ppm/gr) de hembras ovígeras



de *T. borellianus* con distintos estadios de desarrollo de los huevos, mostraron diferencias significativas en huevos en estadios finales. Lo que sugiere que los costos asociados al consumo de oxígeno se acrecientan hacia el final de la incubación. Los cangrejos tricodactílicos estudiados presentan características propias de cada especie tendientes a maximizar su reproducción. Sin embargo, *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* comparten un fuerte comportamiento reproductivo que los caracteriza. La estrategia que cada especie utiliza está relacionada a su interacción con los recursos del ambiente. Teniendo en cuenta que existe una gran presión de competencia intra- e interespecífica y, utilizando los mismos recursos de forma similar, cada una de las especies maximiza su reproducción “utilizando” los recursos en “momentos” diferentes a fin de no solapar las necesidades y consiguiendo desincronizar sus tiempos reproductivos. Así, *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus* consiguen co-habitar un mismo ambiente manteniendo sus funciones poblacionales en buen estado.



Summary

Despite their abundance and importance in the Plata Basin, the reproductive biology of trichodactylids crabs has not been intensively studied at the moment. For this reason, this doctoral thesis aimed to address this issue from morphological, histological, behavioral and physiological aspects in three species of the family Trichodactylidae. Sampling was conducted monthly for 24 months in different points of the Santa Fe Province, where obtained all individuals used. Macroscopic and histological analysis of the gonads were performed in *Zilchiopsis collastinensis* and *Dilocarcinus pagei*, behavioral tests courtship, mating, agonistic behavior and maternal care in *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *Trichodactylus borellianus* and physiological oxygen consumption test under laboratory conditions in *T. borellianus*. The different analyzes were performed in one, two or three species in accordance with the availability of individuals in the environment. For the analysis of oxygen consumption, the size of *Z. collastinensis* and *D. pagei* and stress of these ovigerous females prevented to keep the corresponding tests. The reproductive system of *Z. collastinensis* and *D. pagei* was similar in both species and follows the proposed decapod general pattern, showing distinctive features in both species.

Males have a paired structure with structural and tonal differentiation. The system is divided into testis and vas deferens, which is recognizable by its sexually reproductive males whitish color. Also, the males have a structure in the rear end of the vas deferens transparent-orange in *Z. collastinensis* and transparent-whitish color in *D. pagei*. In immature stages have seen only the testis and vas deferens is been transparent (due to the absence of sperm). The size (carapace width = ACF) observable (testis only) is 28.01-28.69 mm and 23.71-24.41 mm in *Z. collastinensis* and *D. pagei*, respectively. The microscopic structure of the male reproductive system has testicular seminiferous tubules in the lobes grouped and defined by accessory



cells. Within each lobe germ cells are in the same stage of development, observed within tubules spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa in accordance with the degree of maturity of the males. Testicular seminiferous tubules are communicated with the anterior vas by a short collecting duct. In the anterior vas deferens sperm are grouped forming a cluster of sperm which is then encapsulated in the middle vas deferens (VDM) to form spermatophores, which are observed in its light. The vas deferens has a bordering the VDM formed by columnar secretory cells and its rear end but lacking abundant sperm seminal fluid, which is proposed as a reservoir of fluid in the anterior insemination. The presence of both the vas deferens with whitish fat as its distal structure, shows the morpho-physiological maturity by the accumulation of the male sperm.

Females have a single ovary with a "U " inverted mid-dorsal location inside the carapace, with seminal receptacles having an oviduct dorsal link. The ovary is visible in sizes (ACF = carapace width) of 10.50 to 11.70 mm in *Z. collastinensis* and 17.55 to 21.22 mm in *D. pagei* then observándose with a pearly - white color. Reaching between 19.30 to 22.22 mm in *Z. collastinensis* and 21.05 to 25.13 mm in *D. pagei*, the ovary is observed a clear pearly - pink. The microscopic structure of the ovary, in both mature and immature females, has a similar microstructure throughout its shape. Ovarian wall has two layers, an inner and outer germinal connective tissue. In immature female presents a homogenous distribution of oocytes and endogenous vitelogenesis previtellogenesis and germarium central location. Instead mature crabs both species have different types of cells, such as oogonia, oocytes and follicular development in different cells. Both the structure of the distal vas deferens as the shape of the gonad in a "U" are typical of the two species studied, that make a difference to the rest of the freshwater crabs investigated at the moment.

During courtship and agonistic presence copulation it was observed an agonistic behaviors in *Z. collastinensis* and *D. pagei* were



similar, with a having a generally unidirectional pattern in all three species, from males to females in order to maintain control of the reproductive event. Courtship of *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *T. borellianus* were short and aggressive. Courtship consists on a series of movements where the male identifies the female approaches and making one or more pereopods. When they met, females of *D. pagei* made erratic movements with up to pereopods coupling, possibly associated with the mobilization of the structure of the gonopore. Copulations observed, both in the laboratory and in the natural environment- were performed with the "hard" cephalothorax. In all three species passive participation by the female was observed by adopting a lower location compared to male without female retention after the transfer of genetic material. *Z. collastinensis* and *D. pagei* seasonal mating were observed while in *T. borellianus* occurred throughout the year. Parental care in *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *T. borellianus* were observed on the eggs and hatchlings, varying in time relative to the species being proportional to the incubation time and parental care after hatching. Immediately after the eggs deposited in their abdomen, females of *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *T. borellianus* were located out of the water (rocks, caves and vegetation according to the habits of each species).

This behavior could be due to the need to avoid "washing" of water over the egg mass. The incubation under laboratory conditions was between 37-41 days in *Z. collastinensis*, 46-62 days in *D. pagei* and 8-12 days in *T. borellianus*. During the incubation period was recorded maternal care such as ventilation and cleaning of the egg mass. Lateral movement, up-down and sideways, all in order to mobilize the egg mass and the consequent entry of oxygenated water to the abdomen: three types of movements of the pleopods were identified. After hatching, the small crabs were maintained on the maternal abdomen over a period of 30 ± 3 days in *Z. collastinensis*, 34 ± 4 days in *D. pagei* and 10 ± 2 days in *T. borellianus*. Incubation times as much maternal care between different species, showed the strategy of *T. borellianus* to "invest" their



energy so divided in several reproductive events unlike *Z. collastinensis* and *D. pagei*, that only have an annual egg laying. The fertility rate was 1.143 ± 345 eggs in *Z. collastinensis*, 662 ± 117 eggs in *D. pagei* and 83 ± 68 eggs in *T. borellianus*. Fertility (number of live pups per female) was 651 ± 172 in *Z. collastinensis*, 582 ± 8 in *D. pagei* and 63 ± 33 for *T. borellianus*. Consumption rates (ppm/g) of ovigerous females of *T. borellianus* with different stages of egg development, showed significant differences in end-stage eggs. Suggesting that the costs associated with oxygen consumption are increased towards the end of incubation. The trichodactylids crabs studied exhibit species-specific tending to maximize their reproduction characteristics. However, *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *T. borellianus* share reproductive behavior aspects that characterizes them. The strategy uses each species is related to their interaction with environmental resources. Given that there is great pressure of intra-and interspecific competition and using the same resources in a similar way, each species maximizes its reproduction "using" the resources in different "moments" in order to not overlap their needs and getting desynchronized their reproductive times. Finally, *Z. collastinensis*, *D. pagei* and *T. borellianus* get co-occur in the same environment while maintaining their population functions in good condition.



INTRODUCCIÓN

La clase Malacostraca se caracteriza por presentar individuos con 5 somitos cefálicos, 8 torácicos y 6 abdominales. Gran parte de los malacóstracos tienen una morfología compleja, caracterizados por la presencia de pleópodos, con el último par casi siempre diferenciado en urópodos, y una minoría con el cuerpo replegado bajo el cuerpo. Por lo general tienen un tamaño superior al de los demás crustáceos (Kaestner, 1970; Grassé *et al.*, 1985; Lopretto, 1995).

El subphylum Crustacea cuenta con más de 38.000 especies, de las cuales la mayoría de la unidad taxonómica Decapoda se restringe a áreas marinas, pero hay una gran variedad de especies dulciacuícolas semiterrestres y terrestres (Schram, 1986; Melo, 2003) que actúan como procesadores de materia orgánica e integran las cadenas tróficas acuáticas (Melo, 2003; Collins *et al.*, 2006, 2007).

El orden Decapoda se encuentra dentro del superorden Eucarida. Estos crustáceos pertenecen a un grupo muy diversificado en el que se incluyen taxones con un caparazón bien desarrollado formando un cefalotórax compuesto por segmentos cefálicos y torácicos, el que encierra una cámara branquial (Kaestner, 1970; Collins *et al.*, 2004).

Los cangrejos son los decápodos que presentan la mayor especialización morfológica, siendo las principales adaptaciones la compactación y especialización de estructuras, apéndices y tagmas, achatamiento/alargamiento del cefalotórax con fusión epistomial; reducción del abdomen o cefalotórax; asociación de musculatura en la base de los pereiópodos; branquias laminares o filobranquias. Son considerados los crustáceos de mayor suceso evolutivo por la radiación adaptativa que tuvieron (Števcíć, 1971). La capacidad adaptativa de este grupo posibilitó la conquista del ambiente acuático continental, desarrollando patrones de reproducción específicos (Bliss, 1968).

Los decápodos de ambientes dulciacuícolas en América del Sur se agrupan en siete familias (Manning & Hobbs, 1977; Boschi, 1981;



Rodríguez, 1981, 1992; Magalhães & Türkay, 1996a, b, c; Morrone & Lopretto, 2001), disminuyendo a cinco en los ambientes fluviales argentinos (Sergestidae, Palaemonidae, Parastacidae, Aeglididae y Trichodactylidae), siendo muchos endémicos de esta región a nivel de especie, género (Morrone & Lopretto, 1994; Collins *et al.*, 2004).

En nuestra región los verdaderos cangrejos dulciacuícolas se agrupan en la familia Trichodactylidae, con algo menos de 50 especies, las que se distribuyen desde el sur de México hasta el norte de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Magalhães, 2003).

Los integrantes de la familia Trichodactylidae son cangrejos tropicales y subtropicales semiterrestres (Bliss, 1968; Lopretto, 1995), que habitan exclusivamente agua dulce. Los tricodactílicos son fácilmente diferenciados por la presencia de espinas en la margen lateral del cefalotórax y cerdas en los pereópodos (Magalhães, 1991; 2003).

Los tricodactílicos abarcan 12 géneros distribuidos en tres subfamilias: Dilocarcininae (*Bottiella*, *Dilocarcinus*, *Goyazana* y *Poppiana*), Trichodactylinae (*Avotrichodactylus*, *Trichodactylus*) y Valdiviinae (*Forsteria*, *Melocarcinus*, *Rotundovaldivia*, *Sylviocarcinus*, *Valdivia*, *Zilchiopsis*) (Magalhães, 1991; Rodríguez, 1992; Magalhães y Türkay, 1996a, b, c; 2008a, b; Morrone & Lopretto, 1996, 1997, 2001; von Sternberg, 1997, 1998). Estos cangrejos son los macroinvertebrados de mayor talla que habitan las aguas continentales y, en general, viven en aguas poco profundas, con abundante vegetación acuática y refugios, siendo los macrófitos un importante recurso durante su vida. Por otra parte, este taxón interviene en el intercambio de materia y energía entre el sistema acuático y el terrestre. El importante papel que desempeñan se debe a que son depredadores de diversos grupos biológicos y, a su vez, presas de aves, mamíferos y reptiles (Massoia, 1976; Beltzer, 1983a, b, 1984; Beltzer & Paporello, 1984; Navas, 1991, 1993, 1995; Bianchini & Delupi, 1993; Bó & Darrieu, 1993; Lajmanovich & Beltzer, 1993). Los cangrejos tricodactílicos forman un grupo diverso comparado con otras familias



de decápodos del sistema del Plata, reconociéndose diez especies (Magalhães & Türkay, 1996a-c; 2008a; Martin & Davis, 2001; Morrone & Lopretto, 2001; Collins *et al.*, 2002).

Tal vez por los hábitos crípticos, la actividad nocturna o el pequeño tamaño de algunos de ellos, los cangrejos de agua dulce no son tan conocidos como los marinos y existen pocos estudios que aborden temas relacionados a la reproducción de especies dulciacuícolas (Melo, 1967; Magalhães, 1991; Magalhães & Türkay, 1996a-c; 2008a, b; Pinheiro & Taddei, 2005; Darim *et al.*, 2007; Souza da Silva, 2010).

Los estudios sobre la biología y ecología de esta familia son pocos (Taddei, 1999; Melo, 2003; Pinheiro & Taddei, 2005; Amado, 2006; Scarton *et al.*, 2009; Affonso & Signorelli, 2011; Dalosto & Santos, 2011); los aspectos analizados están relacionados a la diversidad y distribución (Lopretto, 1981; Magalhães & Türkay, 1996a-c; 2008a, b; Morrone & Lopretto, 2001; Collins *et al.*, 2002; César *et al.*, 2004; Davanzo *et al.*, 2013), ecología trófica (Williner & Collins, 2002; Oliveira *et al.*, 2009; Alves, *et al.* 2010; Lima *et al.*, 2013), crecimiento (Taddei, 1999; Mansur & Hebling, 2002; Mansur *et al.*, 2005; Pinheiro & Taddei, 2005; Vieira *et al.*, 2013), biología reproductiva (Lopretto, 1976; Taddei, 1999; Souza da Silva, 2010; Lima *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Sampaio Sant'Anna *et al.*, 2013) y comportamiento (Renzulli & Collins, 2000, 2001). En cambio, ha sido estudiada en profundidad la reproducción de muchos decápodos marinos que mantienen relaciones filogenéticas con los dulciacuícolas, como es el caso de algunos cangrejos de la familia Ocypodidae (Castiglioni & Negreiros-Fransozo, 2006; Bedê *et al.*, 2008; Wunderlich *et al.*, 2008), Calappidae (Hebling & Rieger, 2003), Grapsidae (Faria de Oliveira & Arruda-Leme, 2004; Oliveira de Moura & Coelho, 2004; Leme, 2006), Sesarmidae (Lima & Oshiro, 2006), Portunidae (Barreto *et al.*, 2006), Potamidae (Adiyodi & Adiyodi, 1970; Hines, 1986; Gherardi *et al.*, 1987; Gherardi, 1988; Gherardi *et al.*, 1988; Gherardi & Vannini, 1989; Maina, 1990; Micheli *et al.*, 1991).



La reproducción de los decápodos varía ampliamente en las distintas especies (Adiyodi & Adiyodi, 1970; Sastry, 1983; Adiyodi, 1985; Conan, 1985; Hartnoll, 1985; Hartnoll & Gould, 1988; Romero, 2003). Así, una población puede tener una respuesta favorable de su genotipo a un ambiente determinado y tener una reproducción continua, o ser discontinua durante un período determinado del año (Sastry, 1983; Litulo, 2005).

Las características reproductivas de cada especie o población son el resultado de las interacciones de factores endógenos y exógenos (Adiyodi & Adiyodi, 1970; Sastry, 1983; Conan, 1985; Romero, 2003). Los componentes endógenos, tales como las características genotípicas e historia evolutiva, determinan características reproductivas particulares en cada especie. Éstos son modelados por los factores exógenos y están representados por las relaciones entre la densidad de especies, la disponibilidad y abundancia de recursos y los diferentes factores ambientales, tales como condiciones climáticas locales (MacArthur & Wilson, 1967; Pianka, 1970; Ebert, 1994; López-Greco, 1997). También es necesario reconocer que la diferenciación de sexos puede tener un significado en el comportamiento social y reproductivo de cada especie, como por ejemplo en la defensa territorial, combates, desplazamiento, cortejo (Collins, 2001), siendo importante en el balance energético y optimización de la eficacia biológica (Chapman *et al.*, 1999; Wasson *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista fisiológico, la interacción entre la temperatura del agua y el fotoperíodo es una señal que induciría la muda cuando las condiciones del ambiente son las adecuadas para el crecimiento, permitiendo que los ciclos de ecdisis y reproducción se sincronicen adecuadamente (Conan, 1985; Diaz *et al.*, 2003).

El inicio del período reproductivo está relacionado, entre otros factores, con el incremento de la temperatura, momento en el cual se observan pulsos de extrusión de huevos y eclosión de juveniles bien definidos (Ituarte *et al.*, 2004). Así el período de reproducción puede



definirse como el intervalo de tiempo durante el cual se encuentran hembras ovígeras en una población (Cobo, 2002).

La reproducción es un evento cíclico (Giese & Pearse, 1974) marcado por transformaciones morfológicas, fisiológicas y comportamentales. Esta interacción resulta en cambios en el papel que estos individuos desempeñan en la población (Hartnoll, 1985; Oliveira de Moura & Coelho, 2004), siendo el principal evento la transición a la fase adulta, cuando pasan a actuar como agentes reproductores (Oliveira de Moura & Coelho, 2004). En muchos crustáceos este evento sucede luego de la muda puberal, durante la cual se adquieren los caracteres sexuales secundarios (Perez, 1928), estando relacionada en muchas especies también con la madurez sexual (Hartnoll, 1988; Legrand & Juchault, 1994).

En la determinación de la madurez sexual se utiliza un conjunto de métodos que se basan en análisis morfológicos, estudio de las relaciones entre varias partes del cuerpo, crecimiento relativo, observaciones comportamentales en relación con la cópula y cortejo, madurez fisiológica y gonadal (Hartnoll, 1974; Sastry, 1983; Huber, 1985; Sampedro *et al.*, 1997).

Durante el desarrollo gonadal de los decápodos, hay modificaciones en la estructura de las gónadas, que incluye modificaciones de las células gonadales, a saber: crecimiento y proliferación de células goniales, diferenciación y maduración, hasta la ovulación y oviposición, para que luego ocurra la incubación y eclosión de larvas o juveniles en el caso de las hembras (Sastry, 1983; Grassé, 1994).

En el estudio del desarrollo de las gónadas, así como en la estimación de la madurez, el índice gonadal es un método cualitativo de determinación de la madurez que se utiliza a menudo (Haefner & Spaargaren, 1993; Chu, 1995; López-Greco & Rodríguez, 1999). Además, el índice gonadosomático expresa, en porcentaje, el volumen de la gónada con relación al peso total del cuerpo del animal, y es un



indicador del estado de madurez reproductivo del individuo (Vazzoler, 1996). También se utilizan en relación con índices de los órganos que almacenan energía; estos órganos a menudo fluctúan en el tiempo del tamaño de una manera similar a las gónadas (Grant & Tyler, 1983). Es por ello que la gran cantidad de reservas nutricionales y disponibilidad de alimento que requiere el desarrollo ovocitario puede analizarse a partir de índices somáticos durante la maduración de las gónadas. Los índices hepatosomáticos más altos en las hembras comparados con los de los machos, podrían relacionarse con las altas demandas energéticas, siendo el hepatopáncreas el principal órgano de almacenamiento de nutrientes de los crustáceos decápodos (Icely & Nott, 1992) que interviene en la movilización de lípidos hacia el ovario durante la maduración gonadal (Teshima & Kanazawa, 1983; Mourente & Rodríguez, 1991).

Estos altos requerimientos energéticos durante la reproducción podrían modular -junto con otros factores poblacionales- la incorporación de individuos de mayor talla a la población reproductiva. Siendo esta incorporación descendente respecto a las tallas con el progreso de la estación reproductiva, incorporándose a ésta los ejemplares pequeños más tardíamente (Cano & Ocete, 2000; Romero, 2003; Collins *et al.*, 2006). Esta incorporación asincrónica podría deberse también a la presencia de comportamientos agonísticos, siendo la talla un factor importante en el desarrollo de los encuentros entre individuos (Francis, 1988; Figler *et al.*, 1999) y observándose durante la cópula interacciones agresivas (Minei, 1976; Adiyodi, 1988; Gherardi & Micheli, 1989; Micheli *et al.*, 1990).

Los crustáceos dulciacuícolas permanecen mayor tiempo dentro del huevo con relación a sus congéneres marinos, siendo por otra parte menor el número de huevos (Boschi, 1981; Collins, 2000). Durante el desarrollo embrionario se utiliza el movimiento del abdomen junto a los pleópodos, provocando una corriente de agua altamente oxigenada que sería utilizada por los individuos y huevos, independientemente del tipo de hábitat utilizado por los adultos. Esto sugiere que hay un



compromiso con la descendencia a través de la inversión energética empleada en ventilar los huevos (Fernández & Brante, 2003).

Luego de eclosionar, los decápodos presentan un momento de transición durante las fases de crecimiento hasta conseguir su madurez. Como en todos los crustáceos, el crecimiento ocurre de manera discontinua, debido a la exocutícula rígida que se elimina en cada proceso de muda. El cambio entre éstas ocurre por medio de mudas críticas (Collins & Petriella, 1999) hasta llegar a la muda puberal -cuando adquieren su madurez- e indican el inicio de la maduración de las gónadas, dando comienzo una nueva etapa en su ciclo vital.

En base a los antecedentes antes expuestos, esta Tesis tiene como objetivo general caracterizar la biología y ecología reproductiva de cangrejos dulciacuícolas a partir de las especies *Zilchiopsis collastinensis* Pretzmann 1968, *Dilocarcinus pagei* Stimpson 1861 y *Trichodactylus borellianus* (Nobili, 1896) como modelos de la familia Trichodactylidae (Decapoda: Brachyura) en el río Paraná medio.



MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio fue la costa del río Paraná medio a la altura de la ciudad de Santa Fe. Fue diseñado un muestreo a lo largo del eje longitudinal del margen oriental del río Paraná, sobre la costa de Santa Fe (Fig. 1.1).

Se seleccionaron áreas a diferentes profundidades y en sustratos rocosos y arenosos. También en zonas vegetadas y descubiertas de vegetación en diferentes tipos de ambientes (vegetado o sin plantas acuáticas, ríos, lagunas, bañados, etc.) (Fig. 1.2).

En los muestreos sistemáticos se capturaron las especies *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis collastinensis* y *Trichodactylus borellianus*. Los mismos se realizaron con el objeto de seguir el ciclo reproductivo de las poblaciones de estos cangrejos. Para ello el muestreo fue mensual durante 24 meses a fin de identificar el momento más probable de actividad reproductiva.

Muestreos en ambientes naturales

La información obtenida en estos muestreos se ha centrado en la presencia de *Z. collastinensis* y *D. pagei* y su estado de madurez. Parte de las muestras obtenidas fueron procesadas en el laboratorio para obtener información sobre el estado reproductivo en machos y hembras.



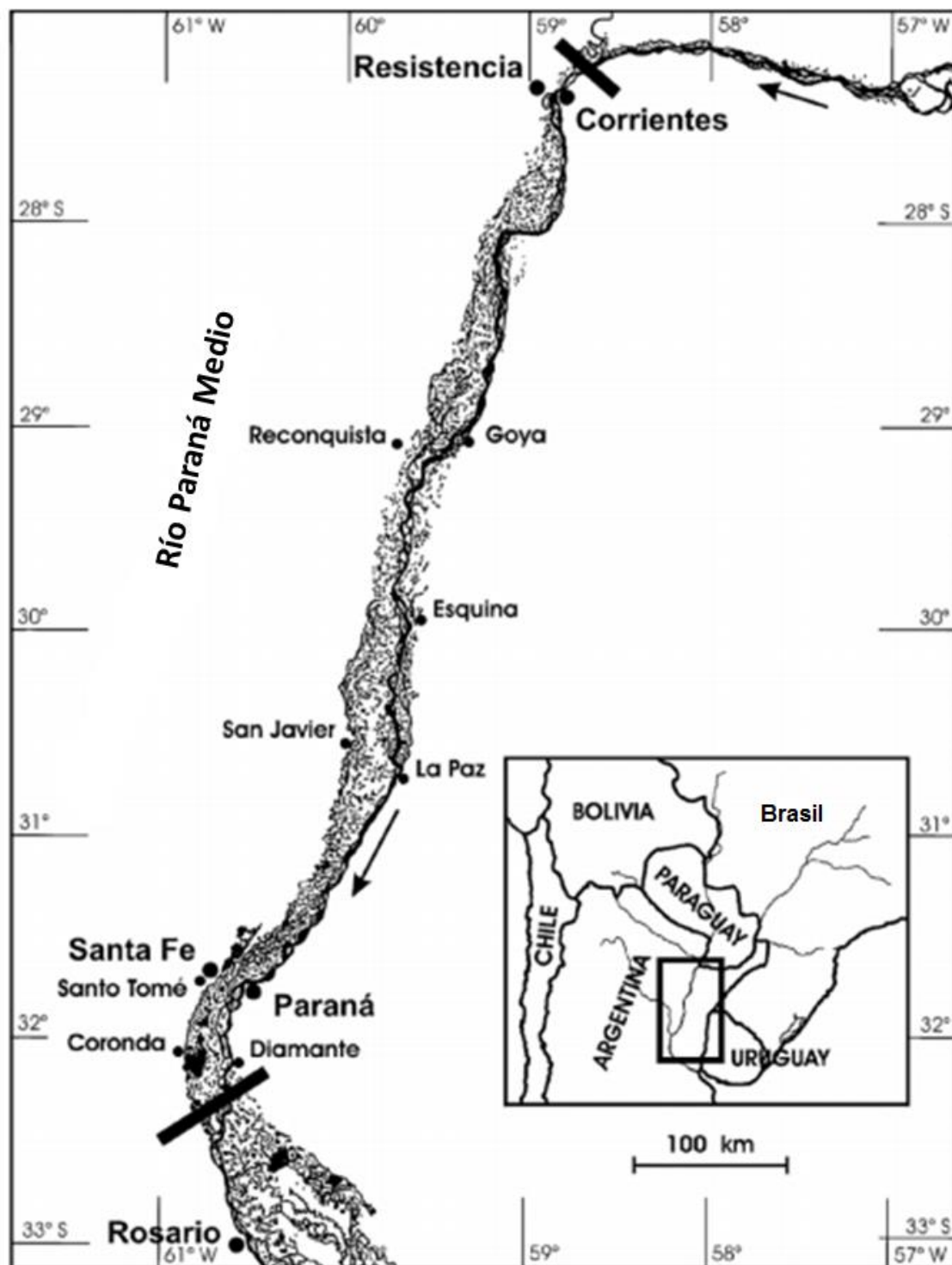


Figura 1.1. Río Paraná medio. Tomado de Iriondo (2007).





Figura 1.2. Ambientes muestreados del río Paraná medio con distintas características y grados diferentes de cubierta vegetal.

Los puntos de muestreo variaron durante el desarrollo de los muestreos, encontrando solo una población de *Z. collastinensis* establecida en la Laguna Setúbal ($31^{\circ} 35' 26.7''$ S, $60^{\circ} 37' 59''$ W) (Fig. 1.3).

El muestreo en este sitio fue mensual a lo largo de dos ciclos anuales (24 meses) entre enero de 2010 y diciembre de 2012. Los ejemplares capturados se utilizaron para todos los ensayos en laboratorio y también los análisis morfológicos e histológicos incluidos en los capítulos siguientes.

Trichodactylus borellianus fue utilizado solamente en algunos ensayos y estudios particulares de consumo de oxígeno y fecundidad.

También se muestrearon otros sitios con el fin de encontrar *D. pagei*, encontrándolo de manera esporádica en algunos puntos.



La recolección en todos los muestreos se realizó mediante copo de mano, realizando cinco réplicas en los diferentes ambientes muestreados y recolección.



Figura 1.3. Laguna Setúbal. Ciudad de Santa Fe, Argentina.

Análisis en laboratorio

Los cangrejos *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *T. borellianus* recolectados y transportados al laboratorio de Macrocrustáceos del Instituto Nacional de Limnología, fueron observados utilizando microscopio estereoscópico y/o lupa binocular de acuerdo a la necesidad de detalles. La determinación de las especies se realizó siguiendo a Magalhães y Türkay (1996a-c, 2008a).

Se estableció el porcentaje y grado de madurez sexual a través de la presencia de órganos reproductores maduros o inmaduros, morfometría e histología. Para ello se observaron los ovarios y testículos macroscópicamente para describir el desarrollo gonadal, clasificándolos de acuerdo a color, tamaño y forma, asociándolos a la presencia o



ausencia de oviductos y/o conductos eyaculadores. Todas estas observaciones se confirmaron a través de la histología de los mismos, identificándose las diferentes etapas de espermatogénesis y ovogénesis de acuerdo a la clasificación propuesta por Bauer (1986).

También se calculó el índice gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH_p), pesando en fresco ovarios o testículos y hepatopáncreas, respectivamente, y relacionándolos con el peso total del cangrejo.

Se tuvo en cuenta la presencia de hembras ovígeras. En base a ello se calculó el número de huevos por hembra, indicando la dinámica poblacional de las especies en el área de muestreo. Se evaluó la relación entre el número y tamaño de huevos, los que se midieron y contaron con auxilio de microscopio estereoscópico, clasificándolos de acuerdo a su color, tamaño y forma. También se establecieron relaciones entre el número de huevos y datos morfométricos de las progenitoras.

Experiencias en laboratorio

Los animales fueron aislados durante una semana en acuarios de 50 litros de capacidad, de 30 cm de ancho, 60 cm de largo y 40 cm de alto, sin refugios, a 25 ± 2 °C y un fotoperíodo 12:12. Cada día, los animales fueron alimentados con músculo de pescado. Para los ensayos se utilizaron los cangrejos intermuda con todos pereiópodos y quelípedos.

Se realizaron diferentes experiencias en condiciones controladas en laboratorio, observando factores que permiten el desencadenamiento de la etapa reproductiva y cambios en el comportamiento que definan un determinado cortejo en las especies.

Fueron determinados cambios en el consumo de oxígeno con relación a la presencia de hembras ovígeras, en *T. borellianus*.

Se observó la presencia de cuidados maternos, tales como el tiempo y tipo de cuidados, presencia de mutilaciones y canibalismo en *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus*.



Los cangrejos fueron pesados completos (peso húmedo total = PT) utilizando una balanza digital (®Ohaus, modelo CS 200) y se tomaron las siguientes medidas morfológicas con calibre digital (0,01 mm de precisión):

Ancho de cefalotórax (ACF): ancho del caparazón (contando la espina orbital, a la altura de la 3° espina del cefalotórax en *Z. collastinensis* y 5° espina en *D. pagei*) (Fig.1.4).

Largo de cefalotórax (LCF): largo del cefalotórax, comprendido desde el extremo del margen medio frontal hasta la parte media-posterior del cefalotórax (Fig. 1.4). Ancho de abdomen (AA): mayor ancho abdominal (a la altura de la fusión del 4° y 5° segmento abdominales) (Fig.1.5)

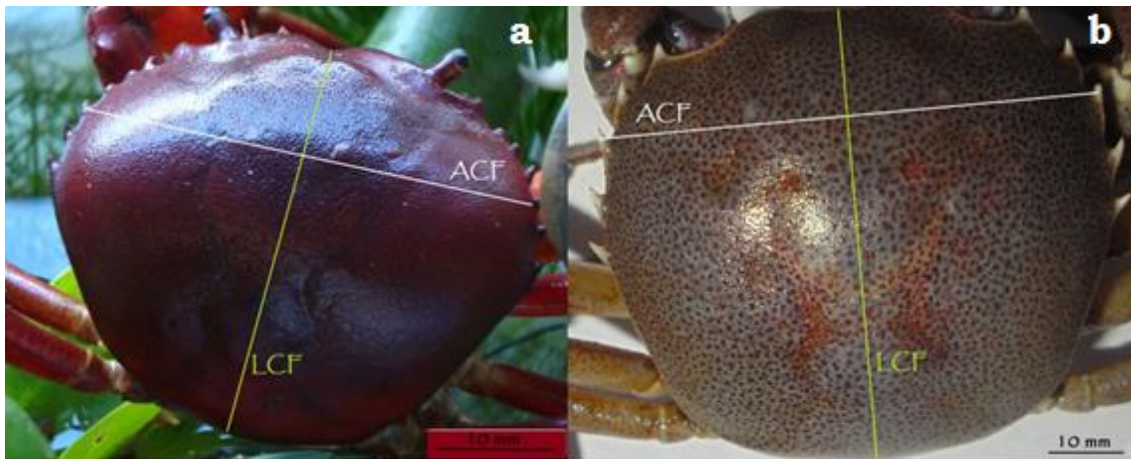


Figura 1.4. Medidas morfométricas en los cangrejos utilizados durante los ensayos. *Dilocarcinus pagei* (a) y *Zilchiopsis collastinensis* (b). ACF= ancho de cefalotórax, LCF= largo de cefalotórax.



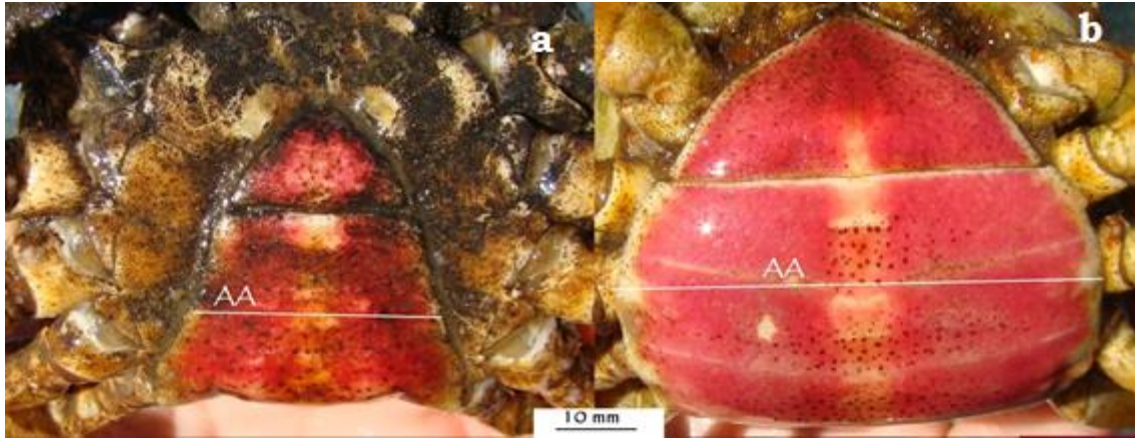


Figura 1.5. Detalle del abdomen de machos (a) y hembras (b) de *Zilchiopsis collastinensis*. AA= ancho de abdomen.

El intervalo de tallas de los ejemplares recolectados fue de 5-60 mm en *Z. collastinensis* y *D. pagei* y de 9-13 mm en *T. borellianus*.



Capítulo 1 – Estructura del sistema reproductivo

Introducción

Los cangrejos tricodactílicos tienen típicamente el cuerpo aplanado dorsoventralmente y de contorno ovalado. En la superficie del caparazón se observan depresiones y surcos que corresponden en parte a la inserción de músculos. Las coloraciones varían desde los tonos ámbar claro, castaños y rojizos, alcanzando colores violáceos en muchos casos, no siendo esta característica un dato taxonómico. En cambio las espinas que tienen en el borde ánterolateral del caparazón tienen un valor específico, cuyo número, posición y forma se encuentra en relación con la especie (Rodríguez, 1980).

El rango de tallas de esta familia varía ampliamente, teniendo ejemplares adultos desde los 10 mm, hasta los grandes cangrejos de 90 mm de ancho de cefalotórax. Para el caso de los tricodactílicos estudiados, se observan dos grupos: cangrejos de pequeño porte, como *Trichodactylus borellianus* y de mediano a gran porte como *Dilocarcinus pagei* y *Zilchiopsis collastinensis* (Magalhães, 1991).

El abdomen de los tricodactílicos, como en general en los Brachyura, está muy reducido respecto al de los Natantia, con la región esternal no calcificada y se encuentra permanentemente doblado debajo de un surco debajo del caparazón. El abdomen de las hembras es más ancho que el de los machos. Las aberturas genitales del macho se encuentran en papilas flexibles situadas en las coxas del quinto par de pereiópodos, las cuales forman el aparato copulador junto con el primer y segundo par de pleópodos. El primer pleópodo, también llamado gonópodo, se modifica para formar un canal en el cual se inserta el segundo pleópodo y sirve de conducto a los espermatozoides. La forma de los gonópodos es un carácter específico de alto valor y el único que permite distinguir las especies de esta familia. La abertura genital femenina o vulva está localizada en el tercer esternito torácico, cerca de



la línea media (Rodríguez, 1980).

La morfología externa de los juveniles es similar a la de los adultos desde el momento en que eclosionan del huevo (Vieira *et al.*, 2013). Esta característica propia de los cangrejos dulciacuícolas se debe a una estrategia reproductiva en la cual el embrión se desarrolla en su totalidad dentro del huevo, sin tener estadios larvales fuera de él (Mansur & Hebling, 2002; Souza da Silva, 2010). De esta manera, el tiempo de desarrollo larval se reduce y emergen del huevo individuos similares a los adultos, con las características de sus progenitores.

La sexualidad de los crustáceos está definida principalmente a nivel genético; sin embargo, los mecanismos por los cuales se diferencian los sexos aún no están del todo claros (López-Greco, 2013). También es importante reconocer que existen factores extrínsecos relacionados con la estructura poblacional, fotoperíodo y temperatura que estarían actuando, como moduladores en la determinación sexual (López-Greco, 2013).

El dimorfismo sexual en crustáceos es muy frecuente, expresándose generalmente en los machos, donde se observa un mayor tamaño del cuerpo o de los quelípedos, como también en muchos casos en la modificación de los pleópodos con funciones copuladoras (Conlan, 1991; Krol *et al.*, 1992; Lee, 1995). En cangrejos, ambos sexos presentan modificación de sus pleópodos con funciones reproductivas. Los machos presentan una diferenciación de los pleópodos, donde el primero es tubular y el segundo actúa como pistón impulsando la masa de espermátóforos hacia el interior de los receptáculos seminales (McLaughlin, 1983; Bauer, 1986; Kronenberger *et al.*, 2004). El abdomen y los pleópodos de las hembras, en cangrejos de agua dulce, se ensanchan y forman una concavidad pronunciada donde se albergan e incuban los huevos.



Las hembras de cangrejos tienen un sistema reproductivo que se limita al cefalotórax. Éste consta de ovarios pareados de ubicación dorsal respecto al sistema digestivo, asociados a oviductos que conducen a gonóporos pares, que se abren en el esterno a la altura de el 3° pereiópodo. Generalmente los ovarios pareados están conectados por un puente de tejido conectivo que les confiere forma de “H”. Algunas hembras han desarrollado estructuras de recepción de espermatozoides, tal como las espermatecas y receptáculos seminales en cangrejos o *telicum* en camarones peneidos o langostas de agua dulce (Krol *et al.*, 1992; López-Greco, 2013).

El ovario es un órgano dinámico que sufre grandes transformaciones a lo largo del proceso de oogénesis (Tsukimura, 2001). Para su estudio la oogénesis puede ser dividida en varias etapas. Durante la primera etapa o fase proliferativa las oogonias se mantienen mitosis y la fase de crecimiento donde los oocitos crecen por la síntesis y captación de sustancias a su ooplasma (López-Greco, 2013). Esta última etapa de “crecimiento” es dividida por Adiyodi & Subramonian (1983) en vitelogénesis temprana o primaria para referirse al período preparatorio de vitelogénesis (previtelogénesis para autores como Dhainaut & De Leersynder, 1976; Johnson, 1980; Charniaux-Cotton, 1985; Meusy & Payen, 1988). Luego el período de vitelogénesis se divide en dos fases, vitelogénesis I o endógena -período de crecimiento lento de los oocitos, donde el vitelo es sintetizado por ellos mismos (Charniaux-Cotton, 1985)- y vitelogénesis II o exógena, período donde el crecimiento ovárico es rápido, por el gran aumento de tamaño de los oocitos que captan el vitelo producido fuera de ellos (Meusy & Charniaux-Cotton, 1985; Abdu *et al.*, 2000; Wainwright & Rees, 2001; Tsukimura, 2001; Vázquez *et al.*, 2008; Wilder *et al.*, 2010). Durante este estadio los oocitos son rodeados por células foliculares (López-Greco, 2013) y el citoplasma se carga de vitelo proveniente del hepatopáncreas, de las células foliculares u otro tejido de acuerdo con la especie (Charniaux-Cotton,



1985; Kulkarni *et al.*, 1991; Abdu *et al.*, 2000; Tsukimura, 2001). Dicho período es seguido por la oviposición.

El sitio de síntesis de la vitelogenina varía en los distintos grupos de crustáceos. En los decápodos, los sitios de síntesis se dan en el hepatopáncreas, los ovarios o ambos (Meusy, 1980; Eastman-Reeks & Fingerman, 1985; Vázquez-Boucard *et al.*, 1986; Van Herp, 1993; Spaargaren & Haefner, 1994; Lee & Chang, 1997; Tseng *et al.*, 2001; Tsukimura, 2001; Yang *et al.*, 2005; Tiu *et al.*, 2006; Santhoshi *et al.*, 2009; Wilder *et al.*, 2010).

Cuando la fecundación es externa, las hembras liberan oocitos poco después de la copulación y la colocación de la espermatóforo. En hembras de especies que mantienen esperma internamente, la liberación de oocitos puede producirse mucho después de que se deposita el esperma en la espermoteca o receptáculo seminal. Así el esperma de una sola cópula puede fertilizar oocitos de más de una puesta (Krol *et al.*, 1992).

Existe una considerable variación entre los taxones de decápodos en el grado de modificación de la morfología femenina relacionada con la recepción o almacenamiento de espermatóforos. En el nivel más bajo de complejidad, una masa espermatofórica es adherida al cefalotórax ventral de la hembra y la morfología de esta región del cuerpo es poco modificada. Una mayor complejidad estructural se observa cuando la masa de espermatóforos es depositado y almacenado en una protuberancia o invaginación del exoesqueleto de la hembra (Bauer, 1986).

En cangrejos eubraquiuros, los receptáculos seminales (RS) son cámaras extensibles de almacenamiento de esperma que se componen de una parte dorsal mesodérmica conectada al ovario, y una ventral ectodérmica conectada a la vagina (Hartnoll, 1969, Diesel, 1991). El RS de los decápodos es un depósito de espermatozoides que almacena el esperma después de la cópula y lo mantiene hasta que se produce la



fertilización. Su origen es a partir de una invaginación del exoesqueleto, una modificación del oviducto o formado por un canal totalmente separado en algunos macruros (Adiyodi & Subramoniam, 1983; Bauer, 1986; López-Greco, 2013).

La madurez ovárica tiene una relación directa con el crecimiento oocitario y éste es directamente proporcional al peso ovárico. Uno de los métodos más utilizado en la estimación de la actividad reproductiva es el índice gonadosomático (IGS) (Courtney *et al.*, 1995; López-Greco, 1997; Ituarte *et al.*, 2006; Zara *et al.*, 2012). Si bien este índice es utilizado en ambos sexos (Chu, 1995), es mayormente utilizado en hembras donde el IGS se utiliza como indicador de madurez ovárica (Grant y Tyler, 1983; López-Greco *et al.*, 1997; Rodríguez-González *et al.*, 2006).

Durante el crecimiento gonadal tienen lugar una serie de modificaciones de las reservas energéticas y nutricionales. En muchos cangrejos estas reservas son enviadas desde el hepatopáncreas hacia el ovario; sin embargo, existen otros órganos de almacenamiento como son los cuerpos grasos (Tom *et al.*, 1987; Souty-Grosset, 1997). No obstante, el hepatopáncreas es en los cangrejos el órgano de almacenamiento energético por excelencia (Cuartas *et al.*, 2002) y por esta razón se utiliza el índice hepatosomático como indicador de la transferencia de reservas desde el hepatopáncreas hacia la gónada.

En crustáceos, el sistema reproductivo masculino es dorsal o dorso-lateral respecto al hepatopáncreas (López-Greco, 2013) y está compuesto por un par de testículos simétricos que se conectan vía colectores con los vasos deferentes que comunican con el exterior a través de un conducto eyaculatorio (Hartnoll, 1969). Dependiendo de la especie, el vaso deferente puede presentar entre tres y diez partes (McLaughlin, 1983). Pero generalmente se observa dividido en tres porciones: anterior o proximal (VDA), mediana o media (VDM) y posterior o distal (VDP) (Johnson, 1980; Krol *et al.*, 1992). Los



espermátóforos generalmente se forman en el VDA, en tanto el VDM produce la mayor parte del líquido seminal y mantiene espermátóforos maduros. El VDP, por su parte, exhibe sacos laterales y está involucrado en la producción de fluidos seminales (Johnson, 1980; Sainte-Marie & Sainte-Marie, 1999; Jivoff *et al.*, 2007).

Las estructuras del sistema reproductivo masculino han sido llamadas de diferentes maneras: “acinos” (Burton, 1995), “lóbulos” (Johnson, 1980) o “conductos seminíferos” (Moriyasu *et al.*, 2002). De igual forma las células somáticas del testículo han sido llamadas “células acompañantes” (Haley, 1984), “células epiteliales” (Hinsch, 1988), “células nurse” (Krol *et al.*, 1992), o “epitelio escamoso” (Garcia & Silva, 2006).


La morfología de los testículos y el conducto deferente, incluyendo espermatozoos y la formación de espermátóforos han sido descritos en varios crustáceos, entre ellos: *Callinectes sapidus* (Cronin, 1947), *Panulirus versicolor* (Talbot & Summers, 1978), *Scylla serrata* (Uma & Subramoniam, 1979), *Scyllarus chacei* (Hinsch & McNight, 1988), *Chionoectes opilio* (Beninger *et al.*, 1988), *Thenus orientalis* (Burton, 1995), *Lithodes maja* (Tudge *et al.*, 1998), *Aristaeomprha foliacea* (Desantis *et al.*, 2003), *Goniopsis cruenata* (García & Silva, 2006) y *Maja brachydactyla* (Simeó *et al.*, 2009). Pocos estudios han utilizado la microscopía de luz para la identificación de las etapas de maduración espermática; las primeras descripciones consistieron en dibujos que representan espermatogénesis en *Menippe mercenaria* (Binford, 1913) y *Cancer magister* (Fijar, 1918). Johnson (1980) y Stewart *et al.* (2010) dieron a conocer descripciones preliminares de principios de espermátidas y espermatozoides en Portunidae. En *Chionoectes opilio*, la maduración espermática ha sido descrita en detalle. Sin embargo, a diferencia de otras especies de braquiuros, en *C. opilio* la maduración espermática ocurre fuera de los lóbulos testiculares, dentro de espermátóforos en el conducto deferente (Sainte-Marie & Sainte-Marie,




1999). En portunoideos, la formación de espermatóforos y el fluido seminal se ha descrito brevemente en *C. sapidus* (Johnson, 1980).


La masa de esperma está compuesta de esperma o espermátidas finales y una matriz de soporte extracelular, se transporta desde los túbulos colectores de los testículos en el lumen de los conductos deferentes. En el conducto deferente, la masa de esperma se rodea por una pared acelular (Talbot, 1989). A pesar de la importancia del espermatóforo en la reproducción de decápodos, poco se sabe acerca de su formación y envasado a nivel ultraestructural. Hinsch & Walker (1974) han descrito la estructura básica de los conductos deferentes. En su análisis ultraestructural de los conductos deferentes proximales de la langosta *Homarus americanus*, Kooda-Cisco & Talbot (1986) describen la producción de espermatóforos.

Teniendo en cuenta los antecedentes antes expuestos, cabe reiterar que los estudios sobre la biología reproductiva de tricodactílicos son muy escasos, contándose solo con el trabajo de Souza da Silva (2010), quien describió la estructura histológica de las gónadas de *Sylviocarcinus pictus* y *S. devillei* y Lima *et al.* (2012) quienes describieron la madurez sexual de *Trichodactylus fluviatilis*. Por su parte, Tadeei (1999) describió el crecimiento relativo y algunas características poblacionales de *D. pagei*, en tanto Mansur (2002) realizó un estudio comparativo entre las fecundidades de *D. pagei* y *S. australis*. Sin embargo, no ha sido estudiada la estructura del sistema reproductivo de ningún tricodactílico en nuestra zona, por lo que se plantearon los siguientes objetivos para este capítulo:

 Describir macroscópicamente y microscópicamente a través de histología la estructura del sistema reproductivo de *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei*.

 Establecer la talla mínima reproductiva (morfológica) de *Z. collastinensis* y *D. pagei*.



 Observar posibles relaciones entre los índices gonadosomático y hepatosomático como descriptores de la actividad reproductiva.



Materiales y métodos

La descripción del sistema reproductor tanto masculino como femenino de *Z. collastinensis* y *D. pagei* fue realizado en base a los cangrejos recolectados durante el período 2009-2012 mencionado en la metodología general. El rango de tallas utilizadas fue 5 y 60 mm en *Z. collastinensis* (N = 90) y *D. pagei* (N = 70).

Análisis macroscópico

La descripción macroscópica de las gónadas de los cangrejos se realizó sobre 50 animales inmaduros de cada especie, en una relación 1:1 de hembras y machos: 20 machos adultos de *Z. collastinensis* y 10 de *D. pagei* y 20 hembras adultas de *Z. collastinensis* y 10 de *D. pagei*.

Los cangrejos fueron pesados y se tomaron las medidas del ancho de cefalotórax (ACF), largo de cefalotórax (LCF) y ancho de abdomen (AA) (ver Materiales y métodos general).

Durante el análisis macroscópico del sistema reproductor, se tuvo en cuenta la presencia, color, ubicación y grado de desarrollo de la estructura completa del sistema. En machos se observó testículo y vaso deferente y en hembras, el ovario, receptáculos seminales y oviductos.

El desarrollo ovárico fue evaluado de acuerdo a la propuesta de Castiglioni *et al.* (2006) clasificando el ovario en tres estadios de desarrollo, a saber: inmaduro, en desarrollo y maduro de acuerdo a su color, volumen y ubicación.

Además se calculó el índice gonadosomático (IG) e índice hepatopancreático (IHP) a través de las siguientes ecuaciones:

$\text{IG} = \frac{\text{peso gónada}}{\text{peso total}} \times 100$	$\text{IHP} = \frac{\text{peso hepatopáncreas}}{\text{peso total}} \times 100$
---	--



Análisis microscópico

Una vez tomadas las medidas morfológicas se procedió a anestesiarse los animales en frío (0°C) durante 20 minutos. Luego sobre un campo de hielo se procedió a abrir con cuidado el caparazón y disecar las gónadas.

Se utilizaron cinco hembras y cinco machos por estación de cada especie.

Las gónadas fueron fijadas en fijador de Bouin durante cuatro horas, y luego se procedió a la deshidratación en secuencia ascendente de alcoholes durante 20 minutos cada uno (70° - 80° - 90° -100°), dos baños de 15 minutos de xilol, dos de 10 minutos de acetona y finalmente incluidos en paraplast en 10 baños de una hora cada uno. Una vez armados los tacos, fueron cortados en micrótopo de rotación en secciones de 5-7 µm de espesor y teñidas con hematoxilina-eosina durante 1 minuto cada uno. Se realizaron entre 3 y 6 preparados por ejemplar, con 5 a 7 cortes histológicos en cada uno. Luego fueron observados en distintos aumentos en microscopio óptico (®Nikon s200).

También se realizó la técnica del aplastado conocido como “squash” como complemento para la observación de los oocitos y presencia de espermatozoides, espermatoцитos y espermatoóforos en el vaso deferente de los machos.

Para clasificar el grado de madurez se tuvieron en cuenta algunos de los criterios histológicos utilizados por Johnson (1980), López-Greco (1997), Zara *et al.* (2012), según los cuales la gónada masculina madura presenta lobulación testicular con presencia de espermatozoides, vaso deferente completo con espermatoóforos y presencia de vaso deferente distal desarrollado completamente. En las hembras se tuvo en cuenta la presencia de oocitos en vitelogénesis secundaria, con la presencia de placas vitelinas características y receptáculos seminales maduros.



Resultados

Los cangrejos comienzan su desarrollo dentro del huevo, teniendo para el caso de la familia Trichodactylidae, todo su desarrollo larval dentro del huevo, siendo abreviado y saliendo de los mismos, individuos similares a los adultos. Sin embargo, estos juveniles eclosionan con una reserva de vitelo, que puede durar desde una hora como en el caso de *T. borellianus*, a una semana como en *Z. collastinensis* y *D. pagei*. Esta reserva podría estar relacionada con que los cangrejos recién eclosionados dispongan de un tiempo hasta la completa calcificación y/o endurecimiento de sus apéndices bucales.

El desarrollo de la gónada es un proceso continuo desde tiempos tempranos cuando se desarrolla el embrión, si bien no es observable hasta una talla que se relaciona con la especie y el sexo del animal. Sin embargo, prácticamente desde que salen del huevo, es posible observar el sexo en cangrejos tricodactílicos. Aunque la morfología del abdomen sufre modificaciones con la madurez, con la ayuda de una lupa son observables los pleópodos masculinos o femeninos.

Sistema reproductivo femenino

Estructura macroscópica

El sistema reproductor femenino de *Z. collastinensis* y *D. pagei* está formado por un ovario (Ov) único, en forma de “U” invertida, comunicado a través de oviductos anteriores con receptáculos seminales (RS) y desde éstos a oviductos posteriores que confluyen en gonóporos pares a la vulva, localizados en el tercer esternito torácico, cerca de la línea media.

El ovario en juveniles inmaduras se ubica dorsalmente, de forma central en el cefalotórax, quedando 80 % debajo del corazón y apoyándose sobre el hepatopáncreas. La hembra debe alcanzar un ACF



entre 10,50-11,70 mm en *Z. collastinensis* y entre 17,55-21,22 mm en *D. pagei* para que su ovario sea visualizado (Fig. 1.6). En un comienzo es transparente y pasa a una tonalidad blanca-perlada y se mantiene así hasta alcanzar una talla de 19,3-22,22 mm para *Z. collastinensis* y de 21,05-25,13 mm en *D. pagei*, donde adquiere un tono nacarado-rosado claro (Tabla 1.1).

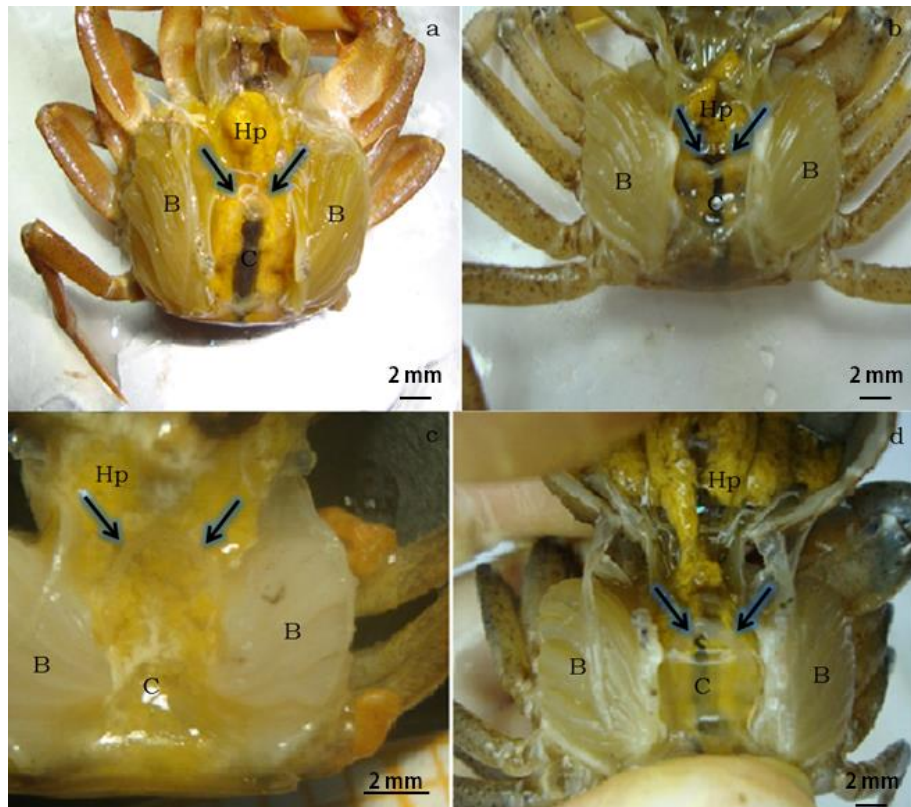


Figura 1.6. Ubicación del ovario en juveniles inmaduras de *D. pagei* (a,d) y *Z. collastinensis* (b,d). Las flechas indican el ovario en forma de “U” invertida y de coloración blanquecina-traslúcida. B = branquias, C = corazón, Hp= hepatopáncreas.

Cuando la hembra alcanza la madurez, el ovario comienza a ocupar más lugar en el cefalotórax, acomodándose el hepatopáncreas a su alrededor (Fig. 1.7-a, b, c). La coloración va cambiando a medida que aumenta su tamaño de tono rosado a naranja claro (Fig. a, b, c), hasta alcanzar un color naranja fuerte al finalizar la maduración, por la presencia de vitelo (Fig. 1.7 e, f, g, h). La forma de “U” invertida y ubicación del ovario se conserva durante todo su ciclo, a pesar de que



éste, al no tener suficiente lugar, comienza a plegarse haciendo zig-zag (Fig. 1.7 e) y luego apoyándose sobre sí misma, llega al borde del corazón (Fig. 1.7 f, g).



Figura 1.7. Ubicación del ovario en hembras adultas de *Zilchiopsis collastinensis*. Las flechas indican el ovario en forma de “U” invertida. a, b: ovario post-puesta, con oocitos atrésicos (color naranja), previtelogénicos (blancos). c, d, e: ovario en crecimiento con oocitos en vitelogénesis exógena. f: ovario en forma de zig-zag para optimizar el espacio a causa del crecimiento oocitario. g, h: ovario totalmente desarrollado y replegado sobre sí mismo, hasta el borde del corazón por falta de espacio. B = branquias, C = corazón, Hp= hepatopáncreas.



Hay una gran diferencia entre un ovario inmaduro y uno post-puesta dada por la organización interna y su estructura general. Un ovario post-puesta, aunque se observe blancuzco como uno inmaduro, se observa flácido y en general con algunos oocitos naranjas aun no reabsorbidos (esto depende del tiempo desde el desove) (Fig.7 a, b). En juveniles inmaduros, los oviductos, RC y gonóporos se presentan de menor tamaño que en una hembra post-ovígera, incluso los oviductos pueden no ser observados y la vulva es de menor tamaño (Fig. 8). También se observa que por lo general el ovario se mantiene en una ubicación inferior respecto al CF, en relación con el lugar que ocupa en una hembra post-ovígera (Fig. 1.7 a, b).

Del ovario surgen un par de oviductos anteriores que conectan a ambos receptáculos seminales y desde estos a través de oviductos posteriores a la vulva (Fig. 9). Aunque en general es un paso que se abre antes del desove, en *Z. collastinensis* y *D. pagei* están presentes desde el momento en que el ovario comienza con su madurez.

Los receptáculos seminales son órganos de almacenamiento de esperma ubicados a ambos lados del CF, bajo la pared de la cámara branquial, encajados en un espacio propio en el cefalotórax que comunica el ovario con el poro genital (Fig. 8). En los tricodactílidos estudiados se observaron RC con conexión dorsal al ovario. Se observan en hembras que se encuentran en la transición juvenil-maduro (17-35 mm) siendo permanentes a partir de su desarrollo (al igual que los oviductos), variando su tamaño de acuerdo al resultado de los eventos de cópula realizados.



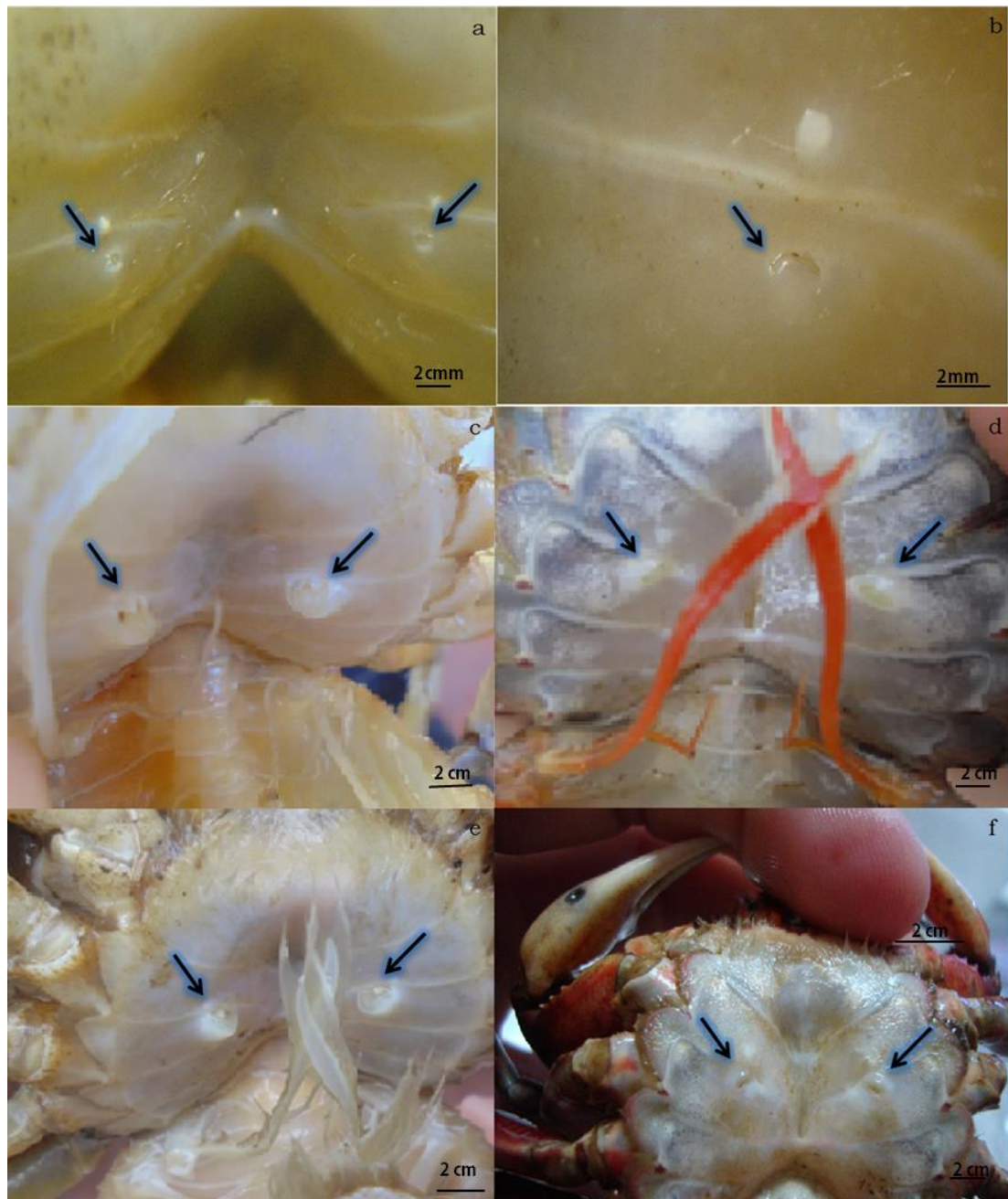


Figura 1.8. Vulva de *Z. collastinensis* y *D. pagei*. a, b: estados inmaduros; c, e: hembras maduras de *Z. collastinensis*; d, f: hembras maduras de *D. pagei*.



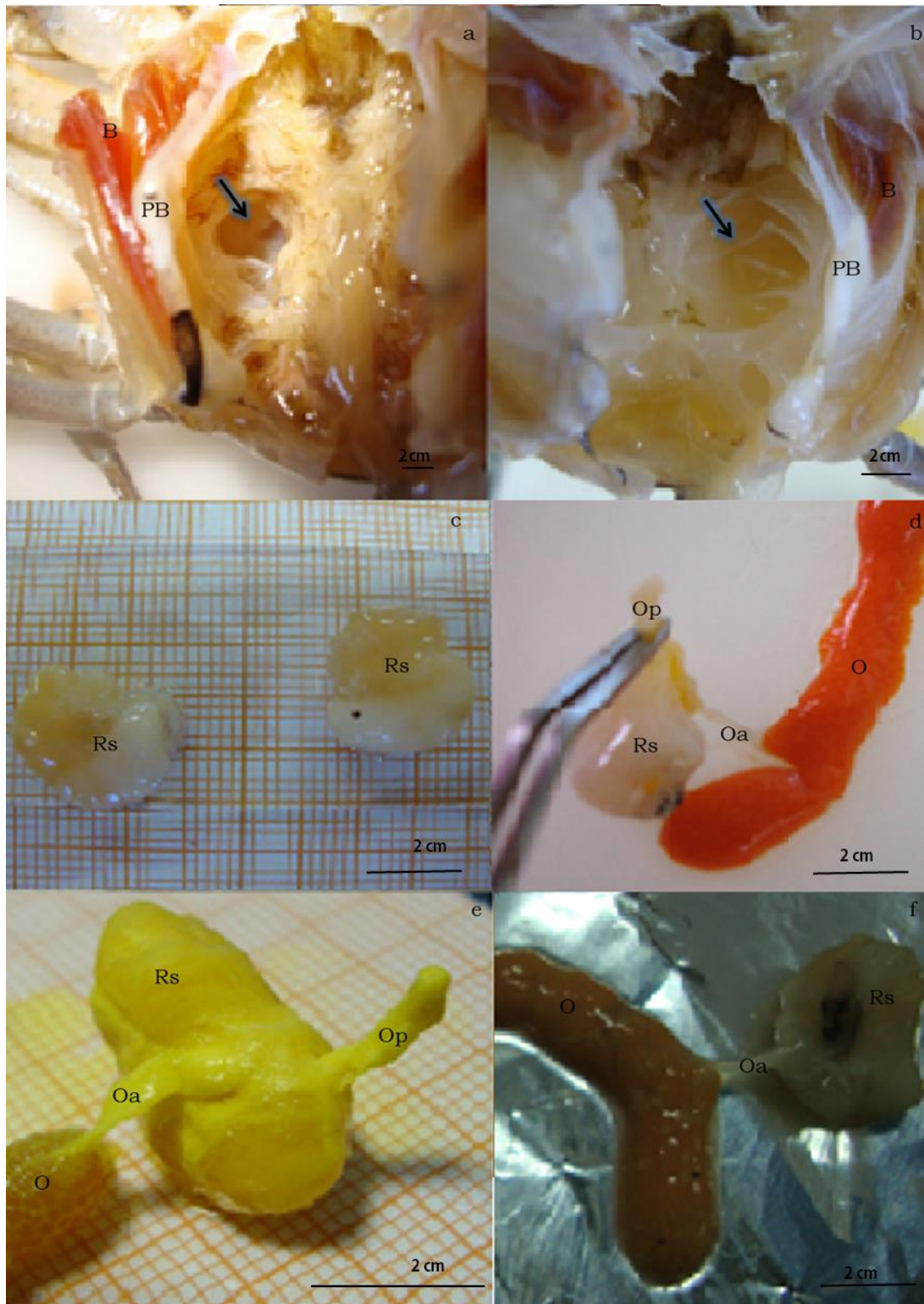


Figura 1.9. Receptáculos seminales de *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei*. a y b. la flecha indica el espacio en el cefalotórax donde se ubican los receptáculos seminales, B: branquias. PB: pared de la cámara branquial. c y d: receptáculos seminales (Rs) de *Dilocarcinus pagei*, O. ovario. Oa. oviducto anterior. Op: oviducto posterior. e y f. receptáculos seminales de *Zilchiopsis collastinensis*.



Índice gonadosomático y hepatopancreático

El mayor índice gonadosomático (IG) fue observado en invierno (5,84) y primavera (5,07) momento en el que el ovario de *Z. collastinensis* adquiere su mayor volumen, ocupando toda la cavidad del cefalotórax. El menor valor, por su parte, se registró durante el verano (1,62) cuando el ovario se encuentra en reabsorción, observándose una marcada estacionalidad y siendo esta diferencia estadísticamente diferente ($p = 0,002$) (Fig. 1.10).

Por otro lado, el índice hepatosomático se mantuvo prácticamente constante, variando entre los valores máximos durante el verano (8,41) y mínimos durante el invierno (6,05) (Fig. 1.10).

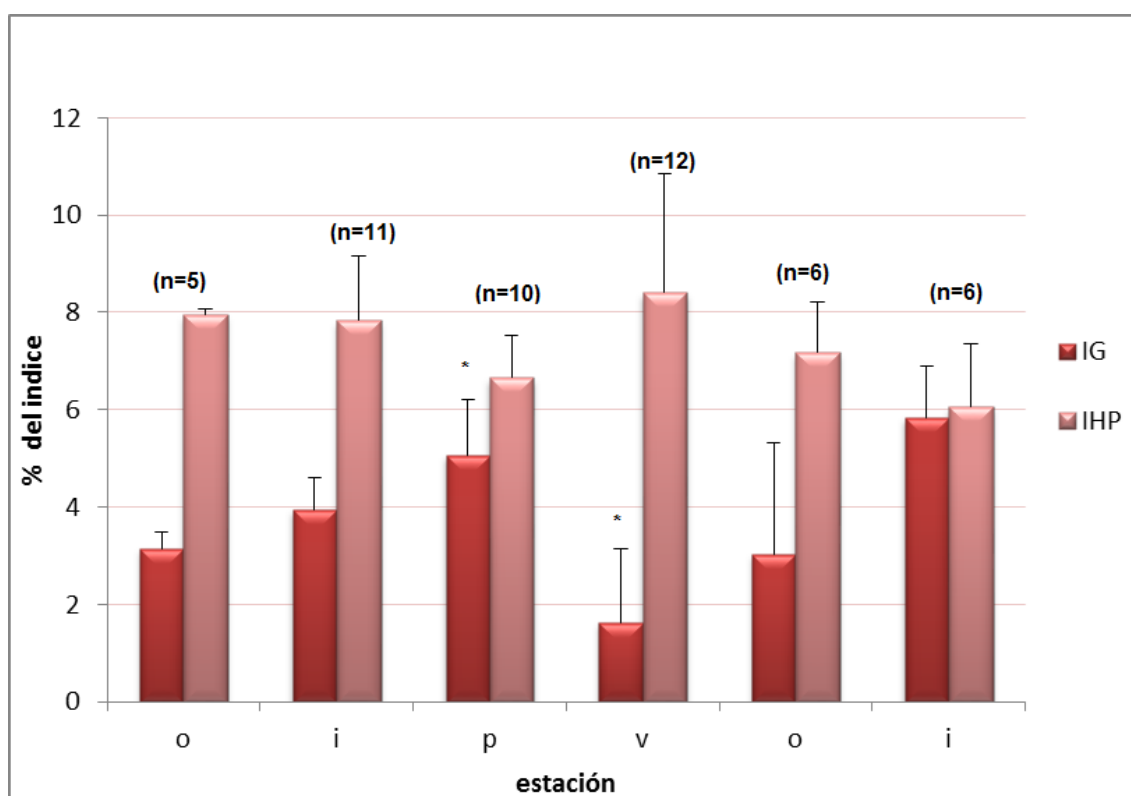


Figura 1.10. Índice gonadosomático (IG) y hepatosomático (IHP) en hembras maduras de *Z. collastinensis* durante los años 2010-2011). Se observa un crecimiento de la gónada hasta alcanzar máximo en primavera y su mínimo en verano, encontrándose la gónada en reabsorción y en un nuevo crecimiento. Las barras de error indican el desvío estándar. El asterisco (*) significa diferencias significativas entre el IG de primavera y verano.

*



Tabla 1.1. Características del ovario de *Zilchiopsis collastinensis*.

Estadio	Desarrollo	Color	ACF (mm)	IG	IHP
I	inmaduro	Trasparente– blanco	0 a 11,99	0	No se calculó
II	En desarrollo	Rosado– naranja claro	12 a 35,99	0,41	3,49
III	Maduro	Naranja– naranja oscuro	36 en adelante	4,31	6,50

Tabla 1.2. Características del ovario de *Dilocarcinus pagei*.

Estadio	Desarrollo	Color	ACF (mm) min–max	IG	IHP
I	Inmaduro	Trasparente –blanco	0 a 21,99	0	No se calculó
II	En desarrollo	Rosado– naranja claro	22-39,99	3,53	5,58
III	Maduro	Naranja– naranja oscuro	40 en adelante	6,61	5,90

Estructura microscópica

En el ovario de individuos juveniles se observa una masa compacta de oogonias y oocitos inmaduros, que se mantienen en pre-vitelogénesis y vitelogénesis endógena hasta la muda puberal, momento en el cual completarán su desarrollo (alrededor de un ACF de 26 ± 7 mm) (Figs.1.11 y 1.12).

El núcleo y nucléolos de los oocitos a lo largo del ciclo ovárico cambian de tamaño y forma, según requerimientos celulares. Las células foliculares, de forma globular, se distribuyen de forma aleatoria por todo el ovario. La pared ovárica es mucho más gruesa que en el resto de los estadios. El *germarium* es marcadamente central en ambas



especies.

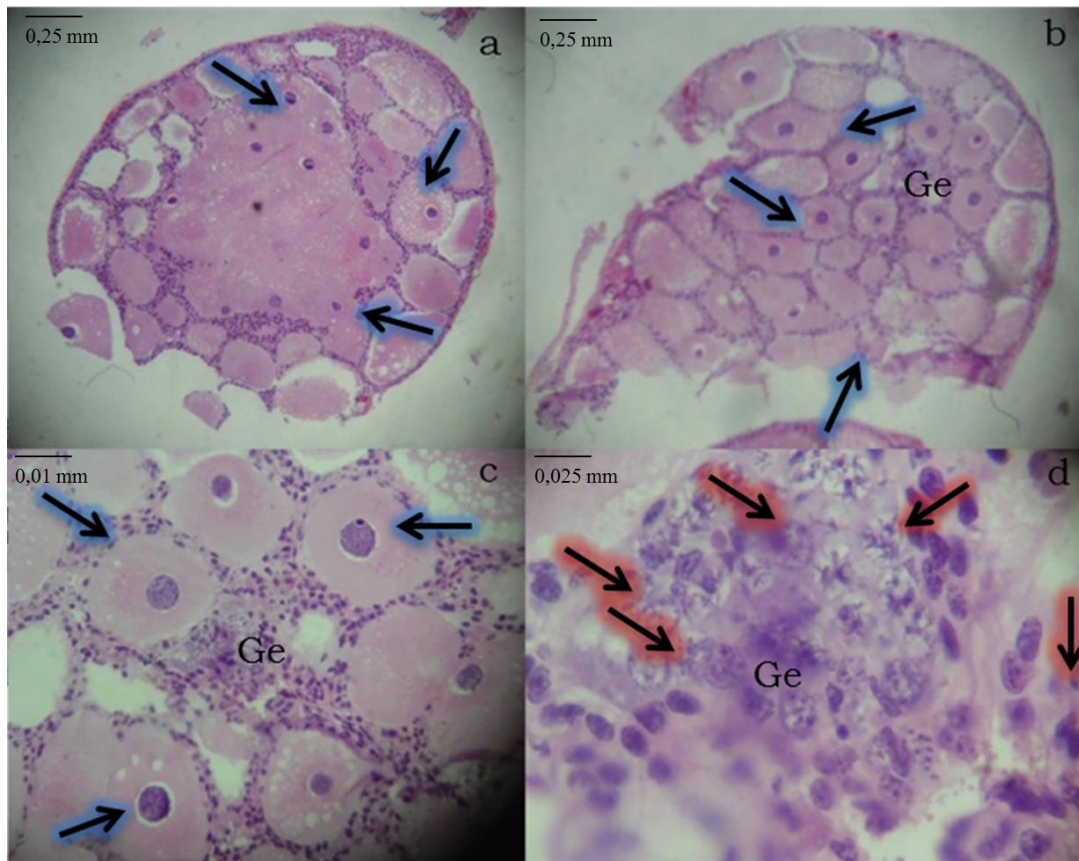


Figura 1.11. Ovario juvenil inmaduro de *Z. collastinensis*. Las flechas rojas indican oocitos previtelogenios; las flechas azules indican los oocitos en vitelogénesis I. Ge = *germarium*.



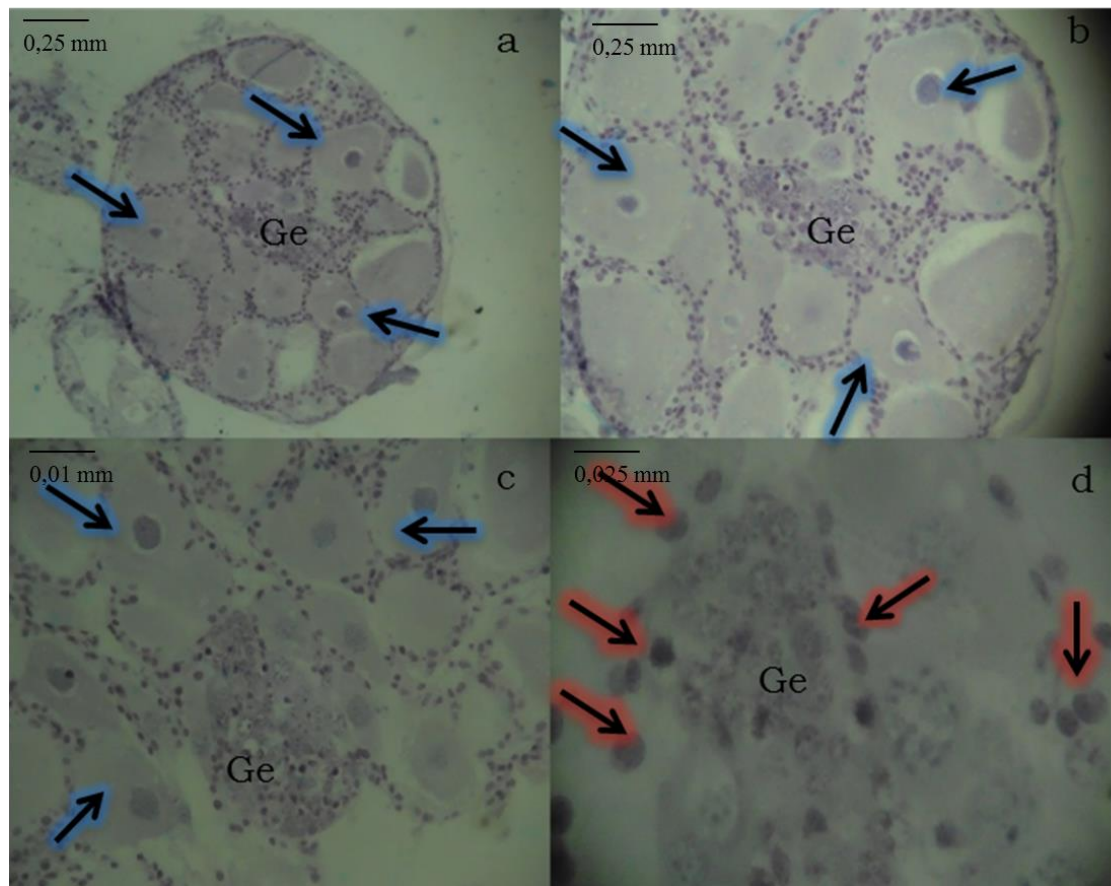


Figura 1.12. Ovario juvenil inmaduro de *D. pagei*. Las flechas rojas indican oocitos previtelogenios; las flechas azules indican oocitos en vitelogénesis I. Ge = *germarium*

Descripción de la gónada en hembras maduras

La pared del ovario se encuentra cubriendo todo el órgano y separa al ovario del espacio hemocélico general. Se encuentra formada por dos capas, una externa de tejido conectivo y una interna germinativa.

A lo largo del ciclo ovárico la pared ovárica sufre modificaciones asociados con el crecimiento oocitario. A medida que los oocitos se van colmando de vitelo, ocupan más espacio y ejercen presión sobre la pared ovárica, volviéndola cada vez más fina. Luego de una puesta de huevos, el ovario adquiere un aspecto flácido, e histológicamente se observan contornos irregulares en forma de “vuelos” donde están presentes los folículos vacíos (Fig. 1.13).



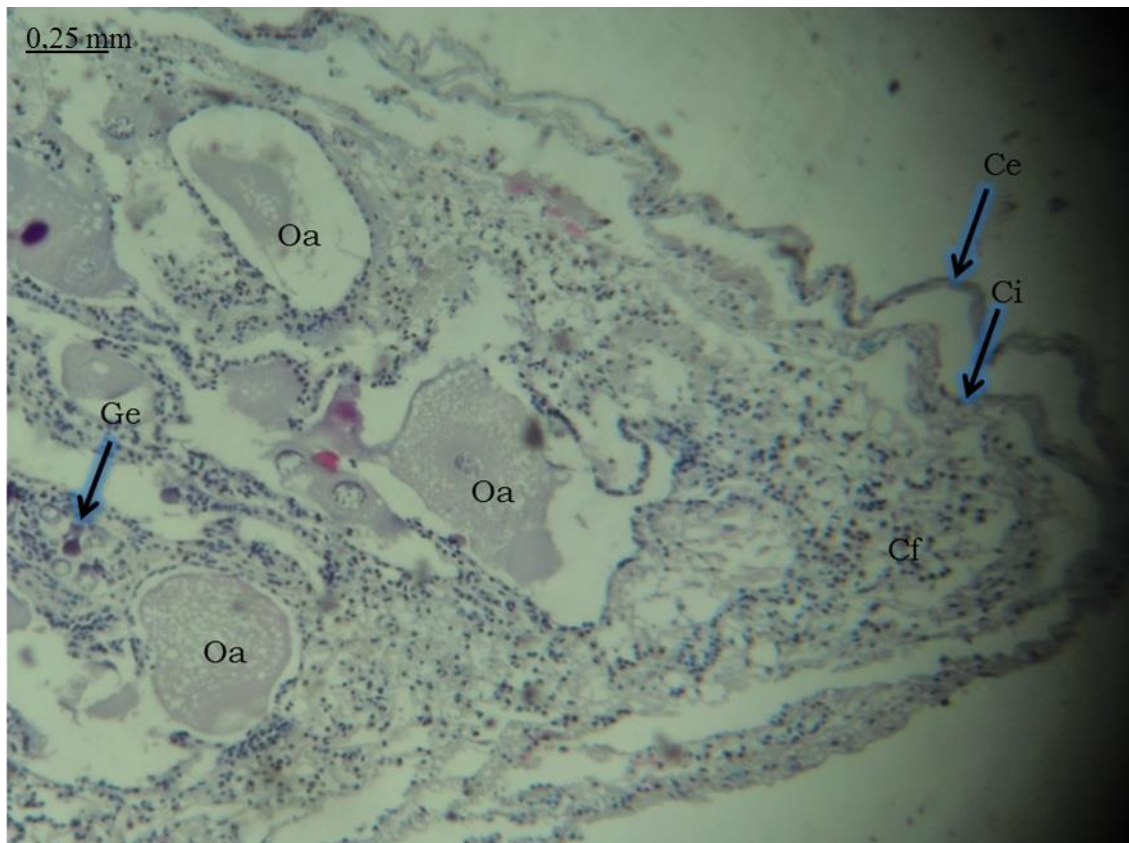


Figura 1.13. Ovario post-desove de *Z. collastinensis*. Ce = capa externa de la pared ovárica. Cf = células foliculares. Ci= capa interna de la pared ovárica. Ge = *germarium*. Oa = oocitos atrésicos.

Dentro del ovario se observaron diferentes tipos de células germinativas, tales como oogonias, oocitos en distinto desarrollo y somáticas, células foliculares. Además se observaron senos hemales entre los folículos del ovario (Fig. 1.14).



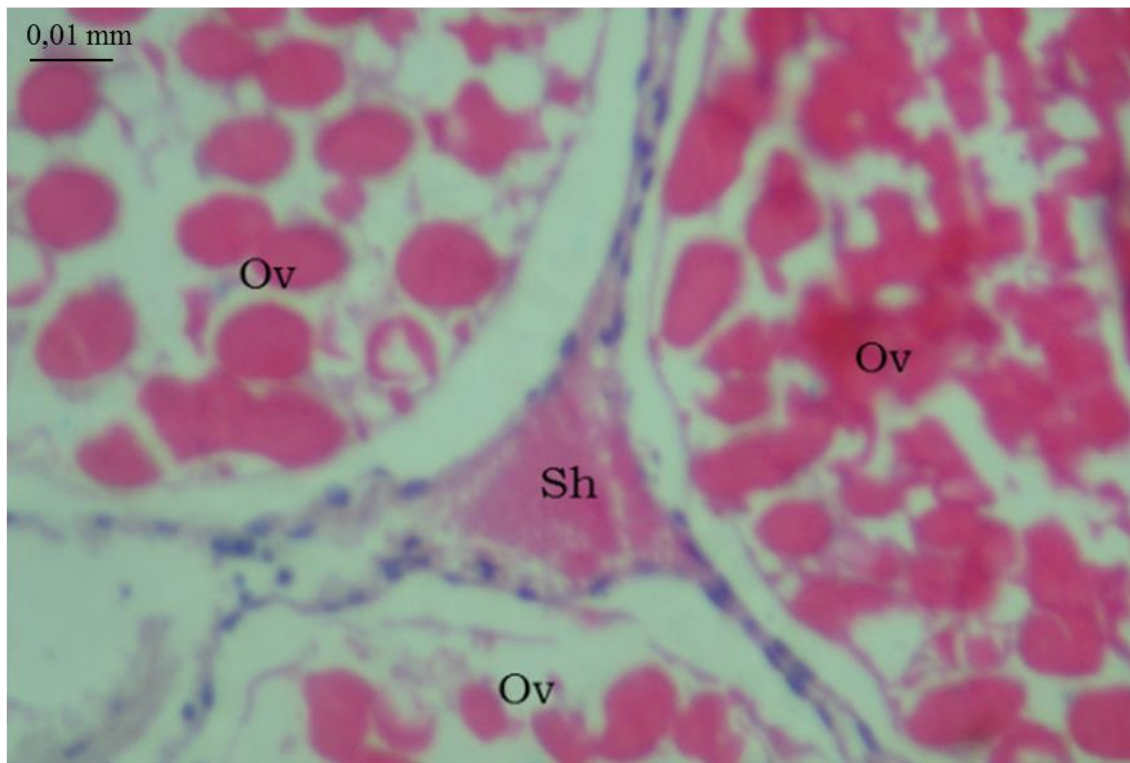


Figura 1.14. Senos hemales entre folículos del ovario de *Z. collastinensis*. Ov = oocito, Sh = seno hemal.

Las oogonias son células germinativas que se desarrollan dentro de “nidos germinales”, *germarium* o “zonas germinativas” y se agrupan entre la pared interna y la zona periférica de la luz del ovario (Fig. 1.15). Dentro de ellas, se observaron dos momentos donde los cromosomas se encontraban condensados en profase meiótica y en su etapa final, con la cromatina dispersa, siempre con un citoplasma escaso y basófilo



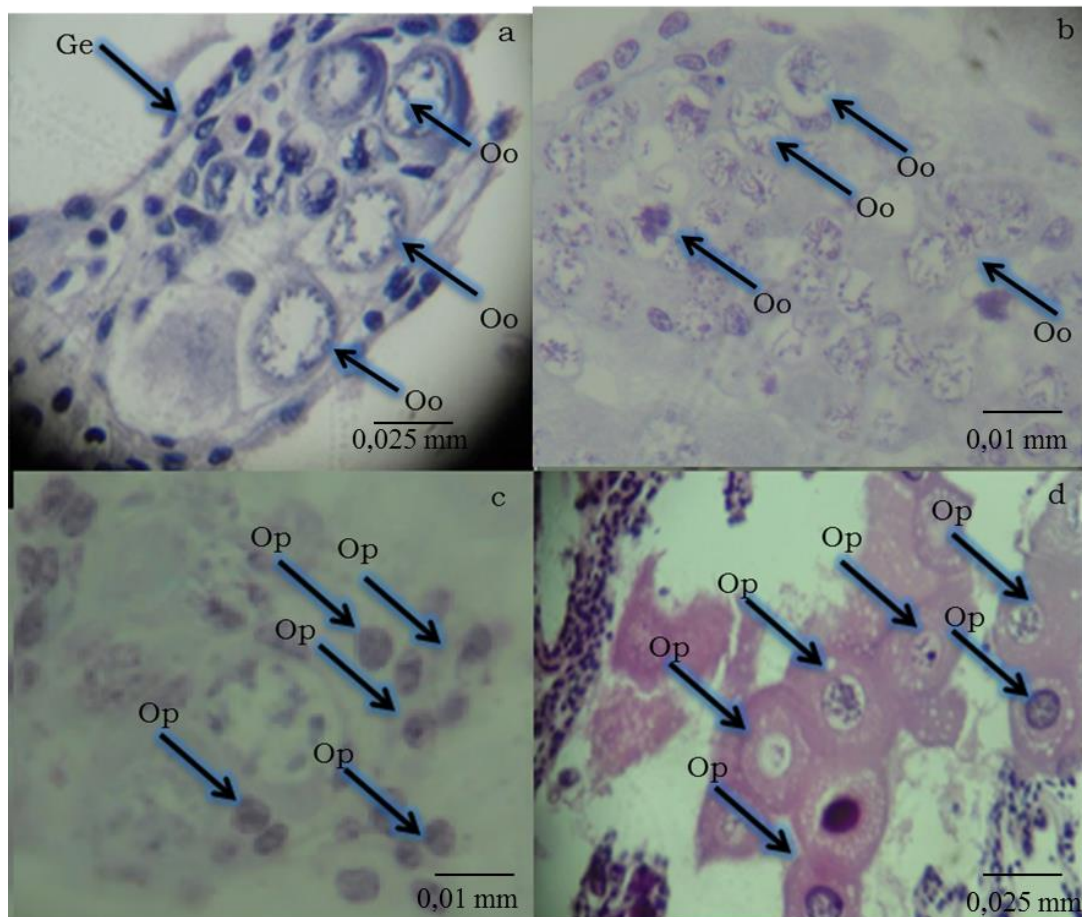


Figura 1.15. Ge = *germarium*, Oo = *oogonia*, Op= *oocitos primarios* en *Z. collastinensis* (a y d) y *D. pagei* (b y c).

Los oocitos primarios se desarrollan en cercanías de las oogonias y encontrándose en pre-vitelogénesis. Durante esta etapa se encuentran asociados a células foliculares de forma globular que comienzan a rodear a cada oocito.

En este estadio se observa el núcleo redondeado, casi esférico y uno o dos nucléolos. El citoplasma, escaso y denso, adquiere una estructura peculiar por la presencia de pequeñas vacuolas o gránulos. Al final de esta etapa las células foliculares, en cantidad variable, pasan de ser globulares a aplanadas, definen el contorno de cada oocito y forman los folículos (Fig. 1.16).



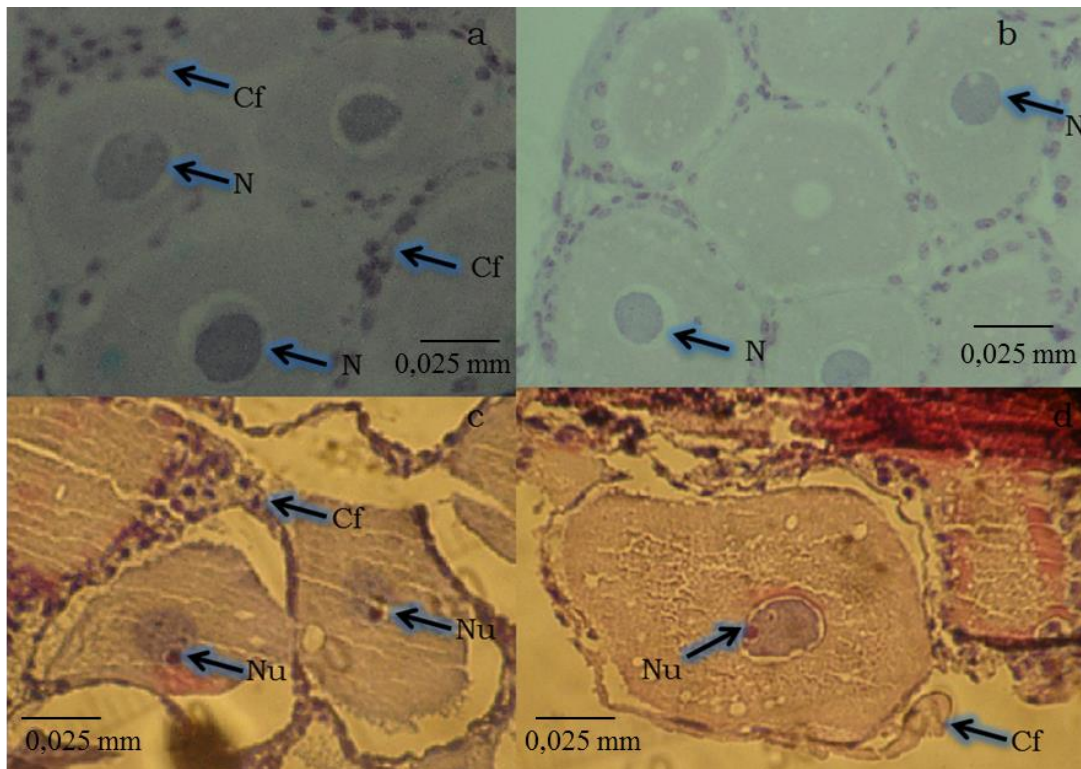


Figura 1.16. Oocitos secundarios en vitelogénesis endógena (a-b) *Dilocarcinus pagei* y (c-d) *Zilchiopsis collastinensis*. Cf = células foliculares, N = núcleo, Nu = nucleólo.

Los oocitos secundarios se observaron en dos estadios. En el comienzo de la vitelogénesis endógena o primaria los oocitos sintetizan el vitelo y aumenta el volumen de su interior, repercutiendo en su tamaño. El núcleo y nucléolos se observaron bien definidos y la célula completa se mantiene basófila. Cuando los oocitos entran en vitelogénesis exógena o secundaria los oocitos aumentan mucho su tamaño, el núcleo no se observa directamente, pero en su lugar hay una zona muy densa en forma de “nube” de vacuolas acidófilas, más pequeñas que en resto del citoplasma celular (Fig. 1.17).



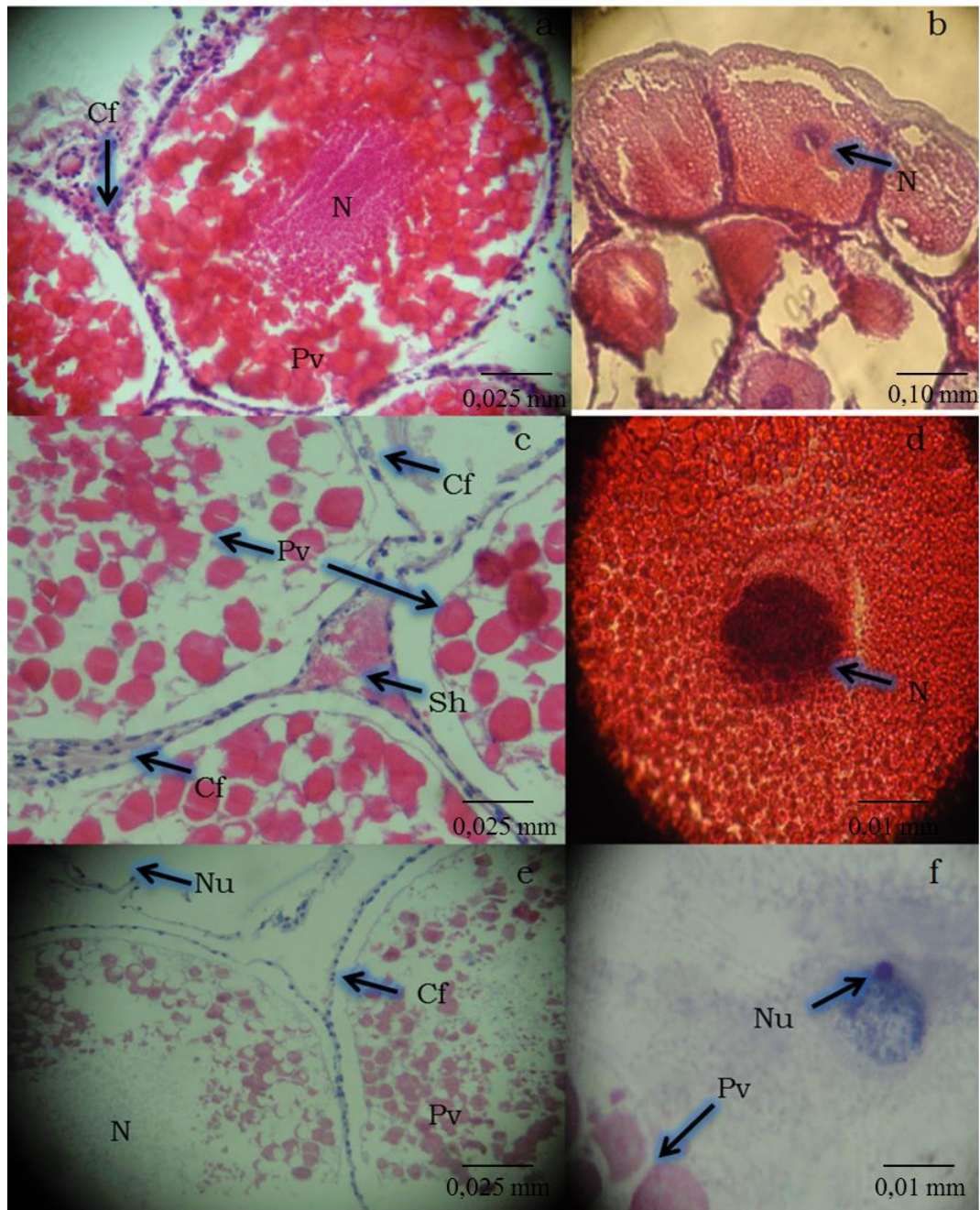


Figura 1.17. Oocitos secundarios en vitelogénesis exógena (a-d) *Z. collastinensis* y (e-f) *D. pagei*. Cf = células foliculares, N = núcleo, Nu = nucléolo. Pv = placas vitelinas, Sh = seno hemal.



Los *germarium* se distribuyen a lo largo de la pared ovárica, en posición dorso-ventral y a continuación en dirección a la luz del ovario. Sin embargo, cuando los oocitos entran en vitelogénesis exógena son difícilmente observables por el volumen que adquieren y el lugar que ocupan en el ovario. Allí se observan oogonias con diferentes estadios y alrededor de éstos oocitos previtelogénicos.

El ovario post-puesta tiene una tonalidad blanca traslúcida, donde generalmente se observan los folículos vacíos, oocitos previtelogénicos, y oocitos vitelogenicos (no ovulados). Estos oocitos “atrésicos” se observan a lo largo de todo el ovario, mostrándose en muchos casos anastomosados formando “lagunas” de citoplasma oocitario. Los *germarium* o zonas germinales se distribuyen de forma irregular en diferentes partes del ovario (Fig. 1.18).

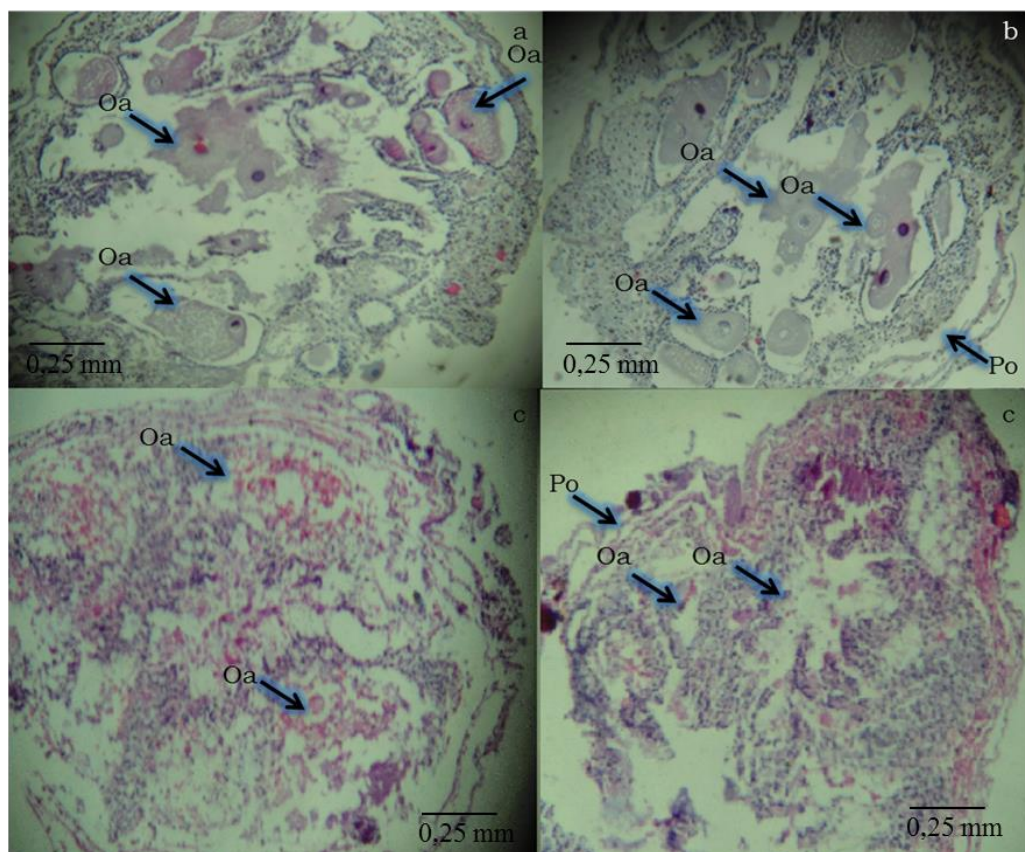


Figura 1.18. Ovario post-puesta de *Z. collastinensis* (a-b) y *D. pagei* (c-d). Oa = oocitos atrésicos, Po = pared ovárica.



En individuos reproductivos o maduros sexualmente, un nuevo ciclo comienza luego de una puesta de huevos, mientras realiza la incubación (Fig. 1.19 y 1.20).

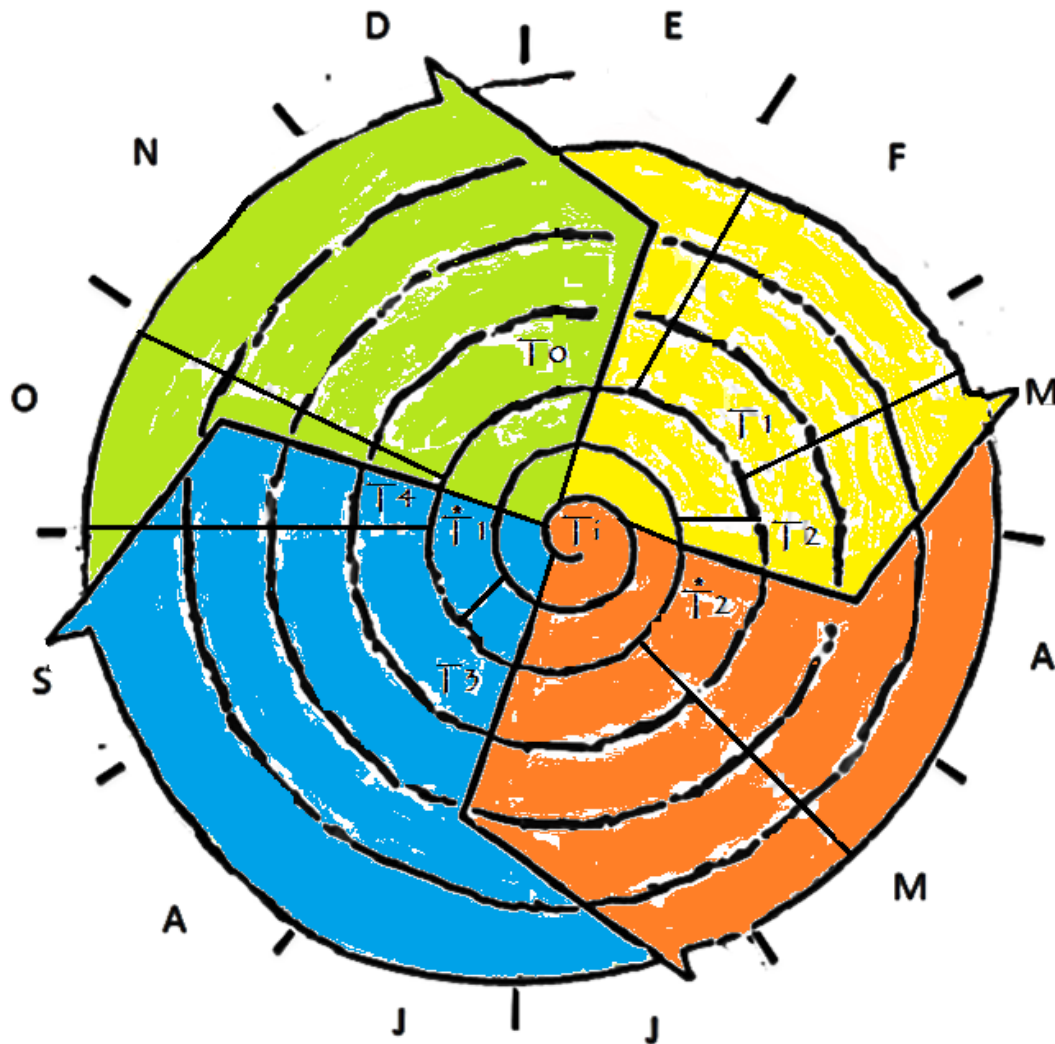


Figura 1.19. Ciclo ovárico de *Zilchiopsis collastinensis*. Ti = tiempo inicial, juvenil recién eclosionado donde no se observa el ovario. T1 = ovario rudimentario e inmaduro, transparente. T2 = ovario blanco-perlado inmaduro, en previtelogénesis a vitelogénesis I o endógena. T3 = ovario en maduración luego de la muda puberal, en vitelogénesis II o exógena. T4 = ovario completamente maduro y listo para la ovulación. T0 = ovario luego de la ovulación y extrusión de los huevos, en estado inicial y luego a previtelogénesis. Las líneas negras indican el comienzo y término de cada etapa. Las letras mayúsculas externas corresponden a los meses del año y los colores a las estaciones: amarillo = verano, naranja = otoño, azul = invierno, verde = primavera.



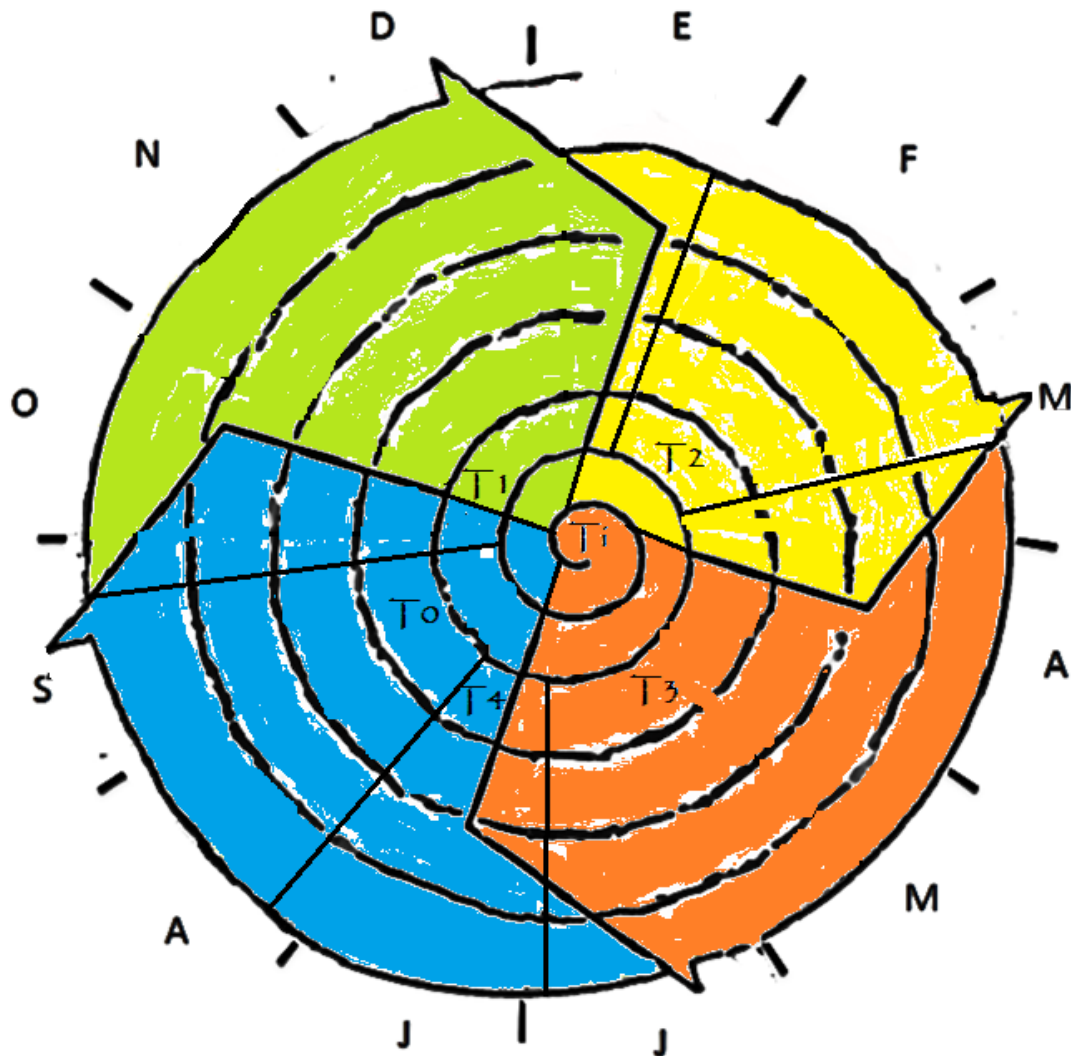


Figura 1.20. Ciclo ovárico de *Dilocarcinus pagei*. T_i = tiempo inicial, juvenil recién eclosionado donde no se observa el ovario. T_1 = ovario rudimentario e inmaduro, transparente. T_2 = ovario blanco-perlado inmaduro, en previtelogénesis a vitelogénesis I o endógena. T_3 = ovario en maduración luego de la muda puberal, en vitelogénesis II o exógena. T_4 = ovario completamente maduro y listo para la ovulación. T_0 = ovario luego de la ovulación y extrusión de los huevos, en estado inicial y luego a previtelogénesis. Las líneas negras indican el comienzo y término de cada etapa. Las letras mayúsculas externas corresponden a los meses del año y los colores a las estaciones: amarillo = verano, naranja = otoño, azul = invierno y verde = primavera.



Sistema reproductivo masculino

Estructura macroscópica

El sistema reproductor masculino (SRM) en individuos inmaduros tiene una ubicación dorso-anterior. Los testículos se ubican a ambos lados del estómago, unidos por tejido conectivo, continuándose con el vaso deferente hasta la parte posterior del animal. En estadios inmaduros sexualmente suele observarse solo el testículo, siendo el vaso deferente transparente y cortándose al disecarlo. La talla observable (solo testículo) es 23,71-24,41 mm y 28,01-28,69 mm en *Z. collastinensis* y *D. pagei*, respectivamente (Fig. 1.21).

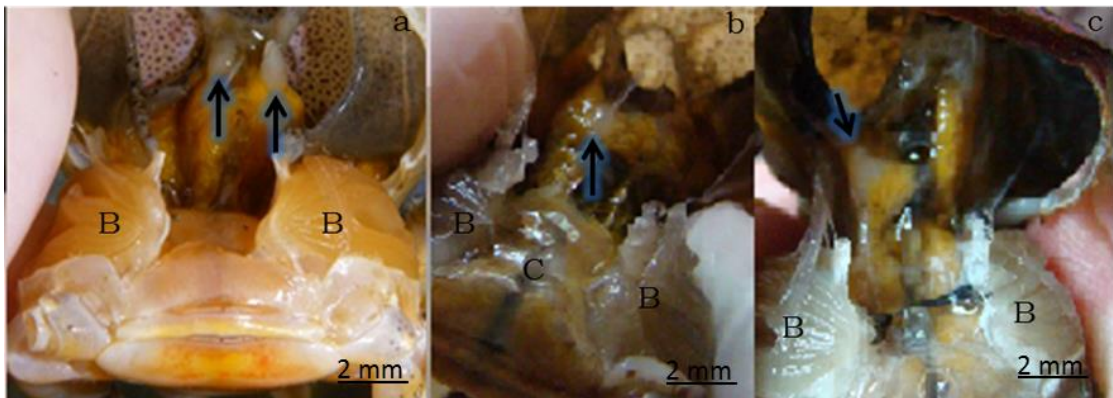


Figura 1.21. Gónada masculina inmadura de *Z. collastinensis* (a-b) y *D. pagei* (c). B = branquias, C = corazón. Las flechas azules indican los testículos.

A partir de estas tallas de ACF la evolución de la gónada es evidente, cambia su color y comienza el desarrollo del vaso deferente el cual toma un color blanco por la presencia de esperma en su contenido (29 ± 3 mm de ACF). A partir de los 35 mm de ACF se encontraron espermatozoides en el vaso deferente.

El sistema reproductor masculino de *Z. collastinensis* y *D. pagei* está formado por dos estructuras alargadas y paralelas. En *Z. collastinensis* ambas estructuras se encuentran unidas por tejido conectivo en la zona anterior -que suele cortarse al disecar el órgano- formando una “U” invertida (Fig. 1.22).

Dicha estructura se encuentra formada por dos testículos (TES)



que contienen un gran número de lóbulos, unidos al vaso deferente por túbulos colectores. El VD se encuentra regionalizado cumpliendo diferentes funciones en: anterior (VDA), medio (VDM), y distal (VDD). El VDA se encuentra muy enrollado en relación a la porción media y distal.

Una vez maduro, el vaso deferente se torna blanco por la presencia de espermatozoides y/o espermátóforos. El SRM se distribuye desde la zona anterior hasta caudal siempre manteniéndose en contacto con el cefalotórax. El testículo maduro adquiere un color amarillo claro y el vaso deferente también cambia su coloración y tamaño. En la parte media se observa color blanco y en su tramo distal su color es amarillento. Además el tamaño del VDM aumenta notablemente cuando el individuo se encuentra en talla reproductiva, generalmente dificultando su disección sin rotura. El VDD tiene dos zonas claramente diferenciadas cuando el macho adquiere la madurez completa. La zona que se continúa del VDM es color amarillento opaco y su extremo distal amarillo translúcido, de aspecto graso en *Z. collastinensis* y transparente en *D. pagei* (Figs. 1.22 y 1.23).

También forman el sistema reproductivo un par de pleópodos funcionales durante la cópula para la transferencia del esperma, ubicados en el primer y segundo somitos abdominales y comunicados a poros genitales a la altura del 5° esternito torácico.



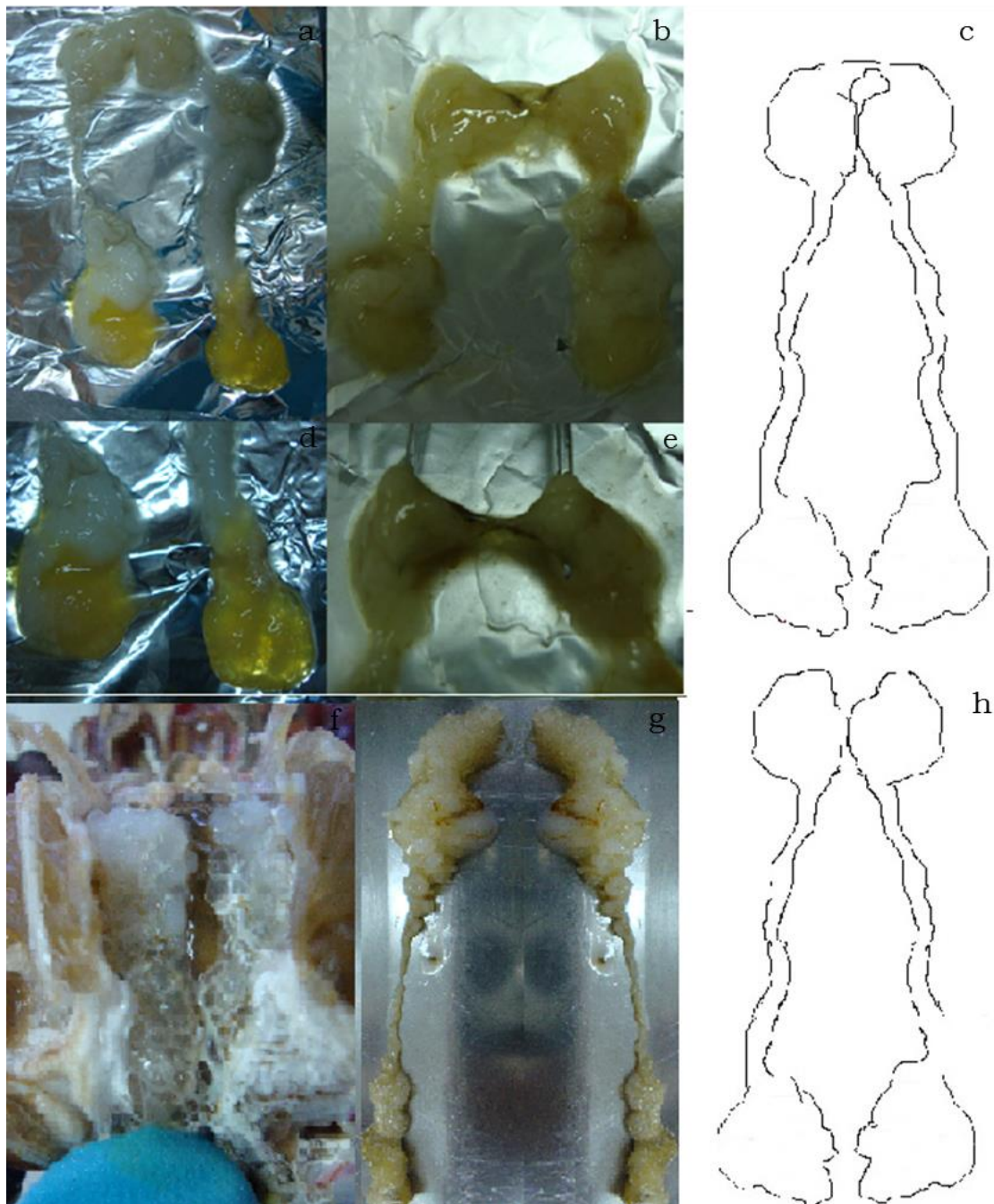


Figura 1.22. Sistema reproductor en forma de “U” invertida de *Zilchiopsis collastinensis* (a-e) y paralelo de *Dilocarcinus pagei* (f-h).



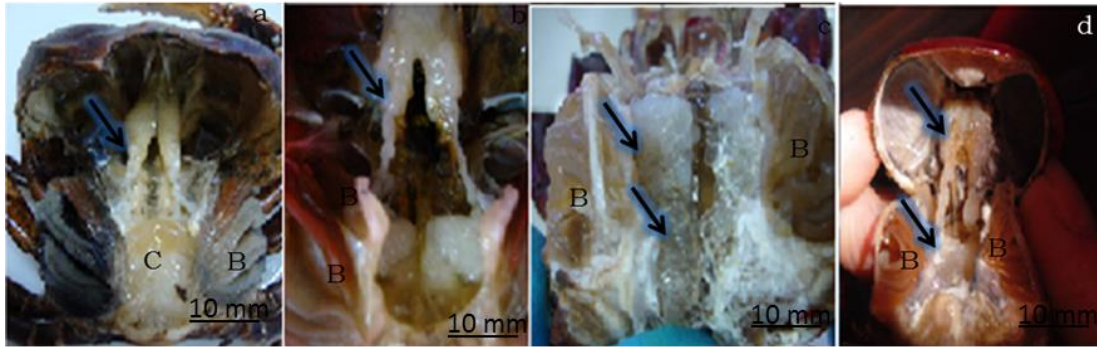


Figura 1.23. Sistema reproductor masculino. *Zilchiopsis collastinensis* (a-b) y *Dilocarcinus pagei* (c-d). B = branquia, C = corazón. Las flechas indican el sistema reproductor.

Índice gonadosomático y hepatopancreático

El mayor índice gonadosomático (IG) fue observado en otoño (5,01) momento en el que el sistema reproductivo de *Z. collastinensis* adquiere su mayor volumen, observándose un vaso deferente medio muy grande, y repleto de esperma. El menor valor se registró durante el verano (2,55), cuando el VDM se encuentra menos dilatado que durante el otoño, pero con abundante esperma en su interior (Fig. 1.24).

Por otro lado, el índice hepatosomático fluctuó de modo similar al IG, siendo máximo durante el otoño y mínimo en verano (Fig. 1.24).

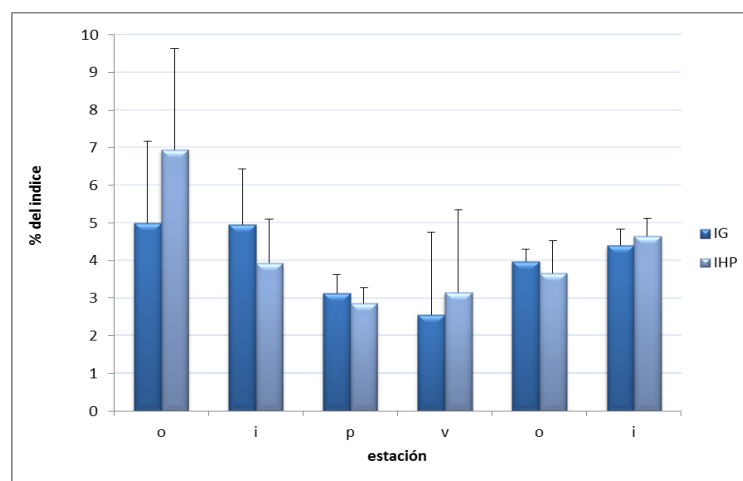


Figura 1.24. Índice gonadosomático y hepatosomático de machos maduros de *Z. collastinensis*.



Estructura microscópica

El sistema reproductor de individuos juveniles se observa no diferenciado, encontrándose presente sólo el testículo que se continúa por un vaso deferente único tampoco diferenciado.

En el testículo se observa una masa compacta de túbulos seminíferos colmados de células germinales y de Sertoli (Fig. 1.25). Esta estructura es seguida por un vaso deferente en el cual se observan espermatozonias y espermatozonios inmaduros (Fig. 1.26).

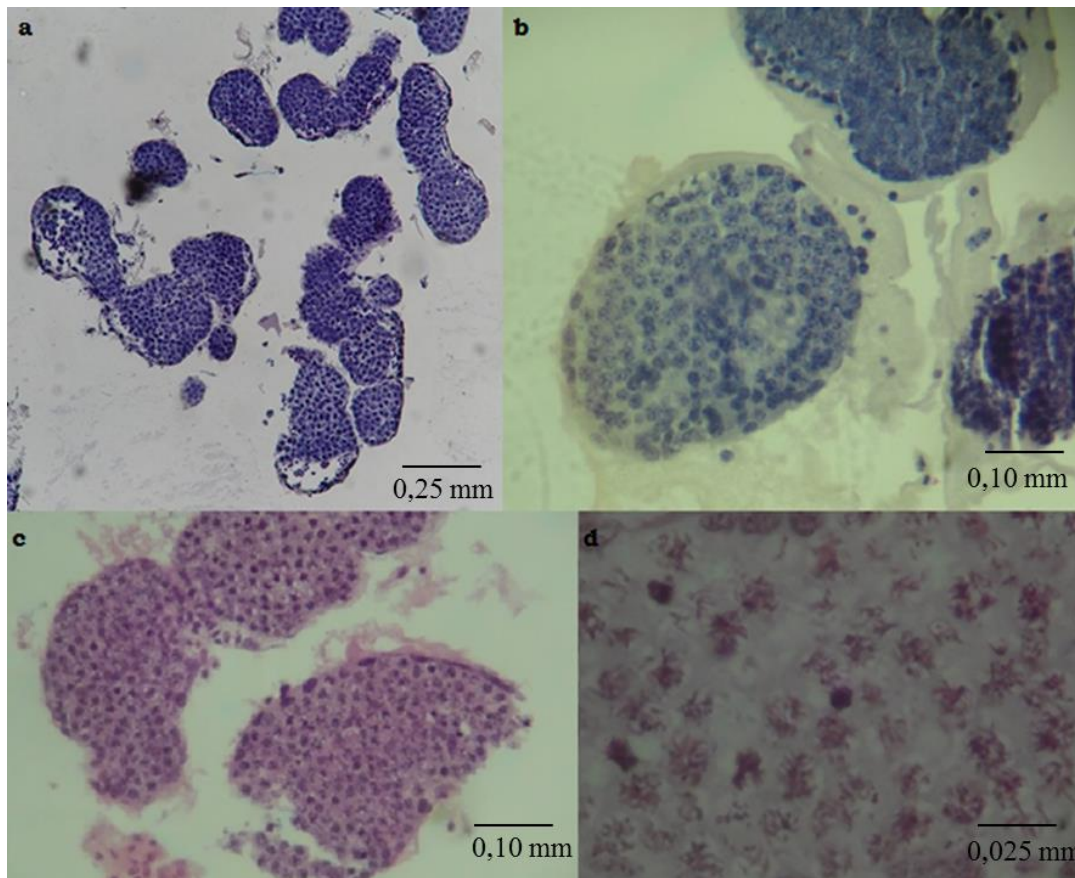


Figura 1.25. Testículo inmaduro de *Z. collastinensis* (a- b) y *D. pagei* (d-e). Se observa los túbulos colmados de espermatozonias.

Las gónadas de *Z. collastinensis* y *D. pagei* se mantienen con esta



estructura hasta la muda puberal (alrededor de un ACF de 29 a 35 mm, en ambas especies). A partir de esta talla el vaso deferente se diferencia en vaso deferente anterior (VDA), medio (VDM) y distal (VDD).

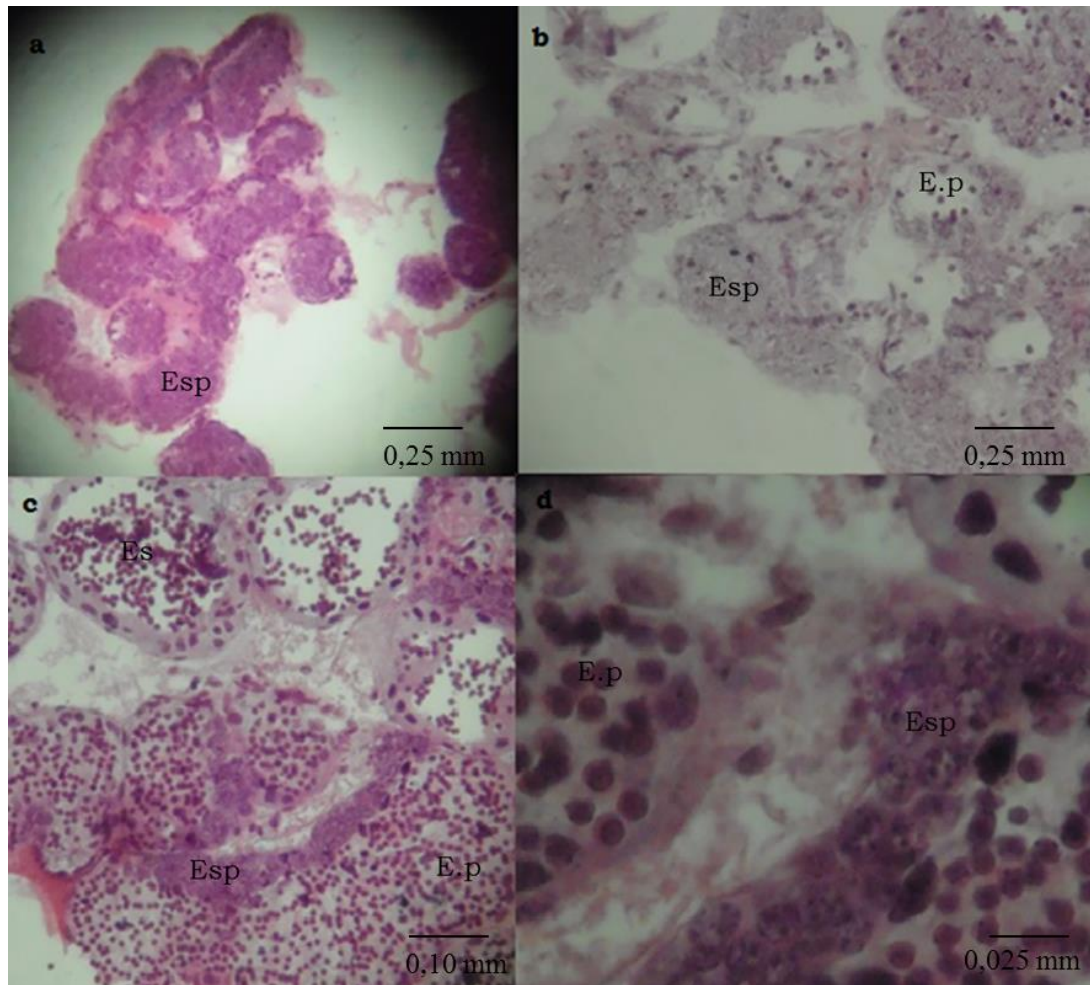


Figura 1.26. Vaso deferente inmaduro de *Z. collastinensis* (b y d) y *D. pagei* (a y c). E.p = espermatocitos. Esp = epermatogonias.



Descripción de la gónada en machos maduros

Tanto los testículos de *Z. collastinensis* y de *D. pagei* se observaron histológicamente similares. Su estructura lobular, con múltiples túbulos seminíferos ultraenrollados dificulta el seguimiento de los mismos, los que finalmente convergen en un conducto colector que comunica al vaso deferente.

Cada túbulo seminífero está rodeado por una fina cápsula de tejido conjuntivo y se agrupan formando un lóbulo, el cual está delimitado por las células accesorias aplanadas y con escaso citoplasma (Figs. 1.27 y 1.28). Dentro de cada lóbulo las células germinales se encuentran en la misma etapa.

Dentro de los túbulos seminíferos se encuentran espermatogonias, espermátocitos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides.

Las espermatogonias se hallan en los centros germinales con abundantes gránulos fuertemente basófilos (Figs. 1.27 a, b, c y 1.28). Se ubican colmando los túbulos seminíferos en la zona apical de los testículos (Figs. 1.27 c, g y 1.28) y se extienden sobre uno de los márgenes, cerca de la periferia de los lóbulos testiculares, hasta desaparecer en la zona media de los testículos, rodeados por células accesorias, de Sertoli o nodrizas (Figs. 1.27 d y 1.28).



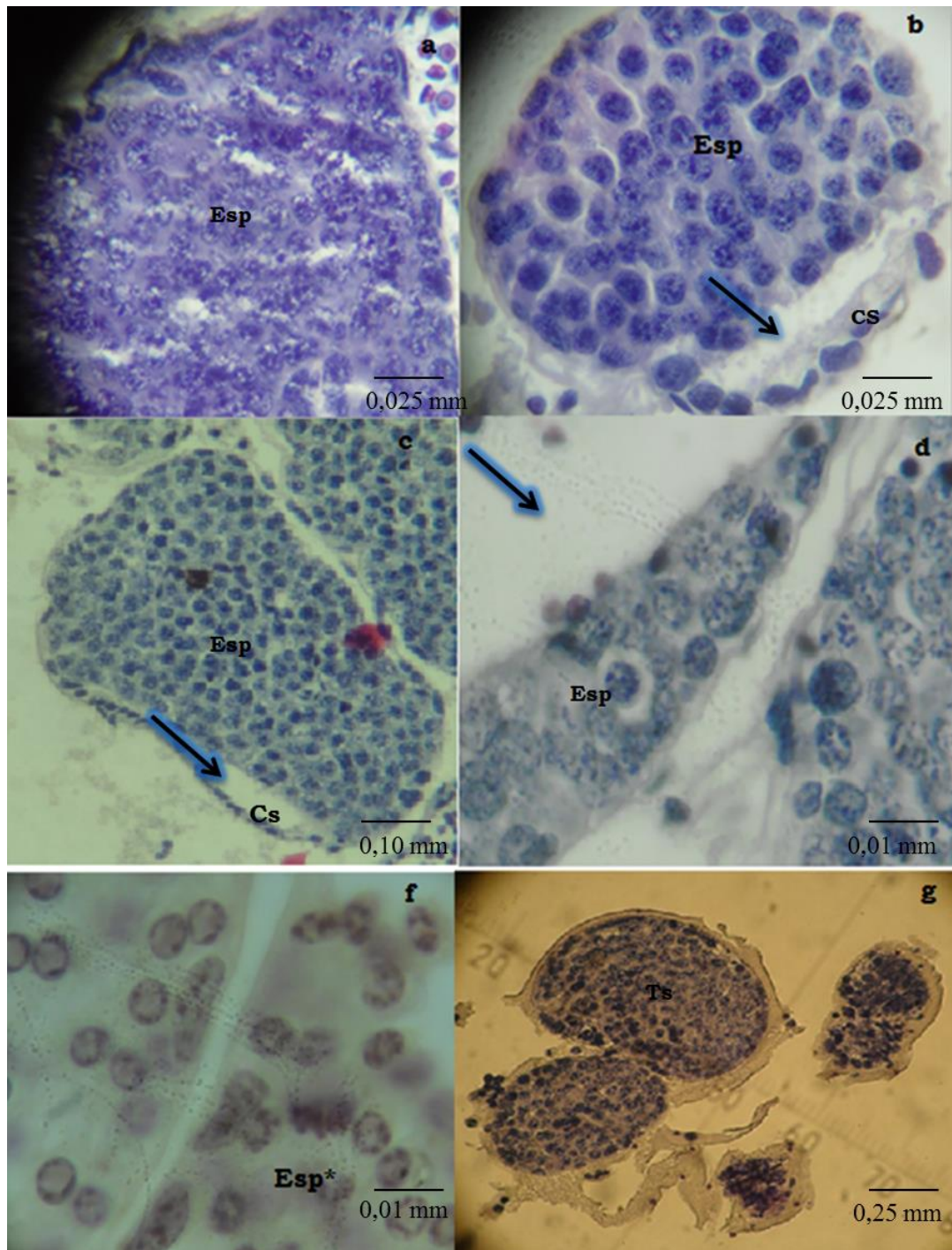


Figura 1.27. Túbulos seminíferos del testículo de *Z. collastinensis*. Las flechas indican la luz del túbulo. CS = células de Sertoli. Esp = espermatogonia. Esp*= espermatogonias, en división. Ts = túbulo seminífero



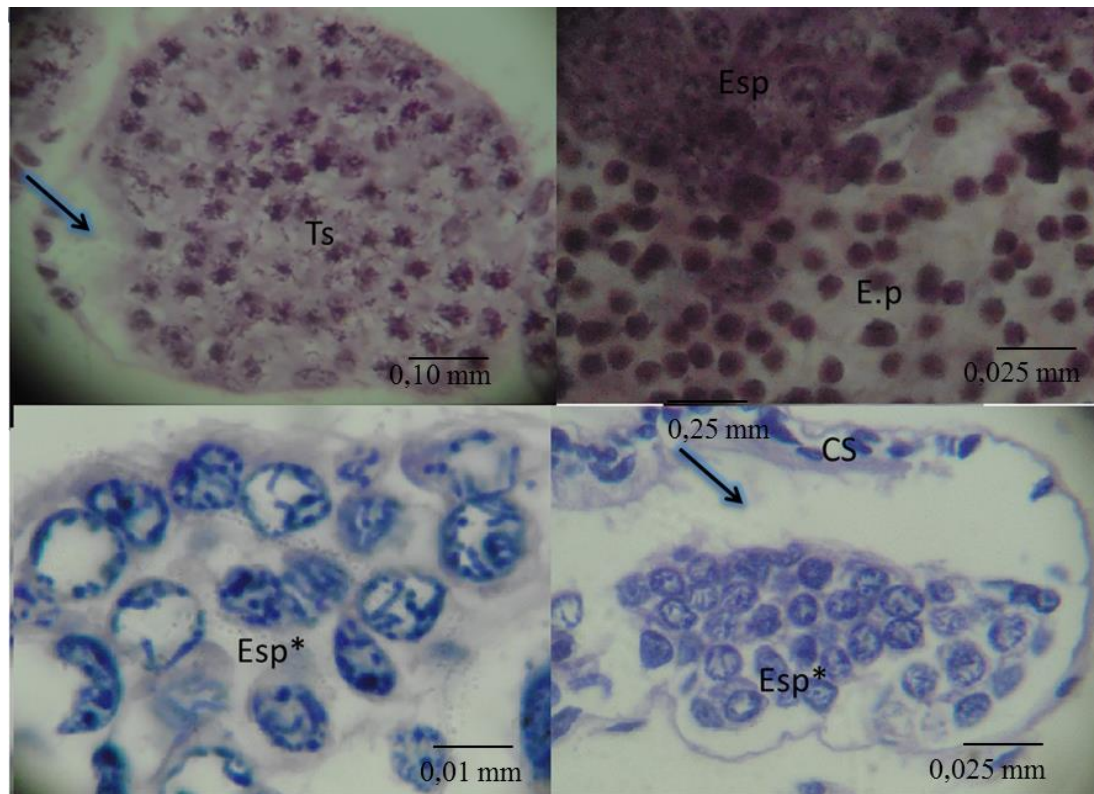


Figura 1.28. Túbulos seminíferos del testículo de *D. pagei*. Las flechas indican la luz del túbulo. E.p = espermatocitos. Esp = espermatogonias, Esp* = espermatogonias en división, CS = células de Sertoli, Ts = túbulo seminífero.

Los espermatocitos se caracterizan por tener una estructura globular y tinción basófila, en tanto las espermátidas se observan más elongadas y su tinción es diferenciada, siendo proporcionalmente más acidófilas (Figs. 1.29 y 1.30). Se observaron espermatocitos en posición basal respecto a la membrana en la zona germinal de los túbulos seminales en ambas especies (Fig. 1.30).



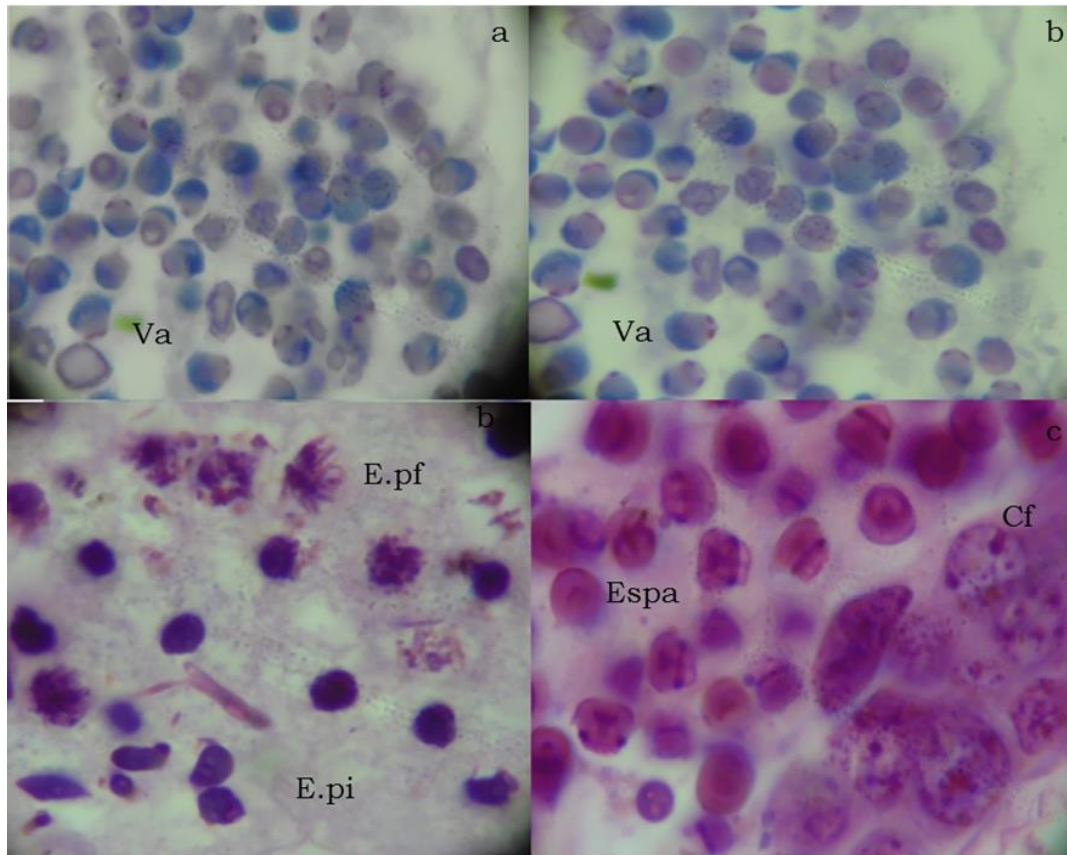


Figura 1.29. Espermatocitos de *D. pagei*. . Cf = células foliculares. E.pi = espermatozoides inicial. E.pf = espermatozoides final. Espa = espermátida. Va = vesícula acrosomática

Dos estados de desarrollo fueron identificados: inicial y en división o final (Figs. 1.28 y 1.29).

Los espermatozoides iniciales se caracterizan por presentar el citoplasma con cromatina dispersa y pequeños acúmulos de heterocromatina, observándose picnóticos. Los espermatozoides finales se encuentran en meiosis, observados en posible telofase (Figs. 1.28 y 1.29 b).

Se identificaron espermátidas en estadio inicial observándose el núcleo en forma de “C” en *Z. collastinensis* (Fig. 30 b) y un estadio final con la presencia de la vesícula acrosomática (Figs. 1.30 c, e y 1.29 a, b).



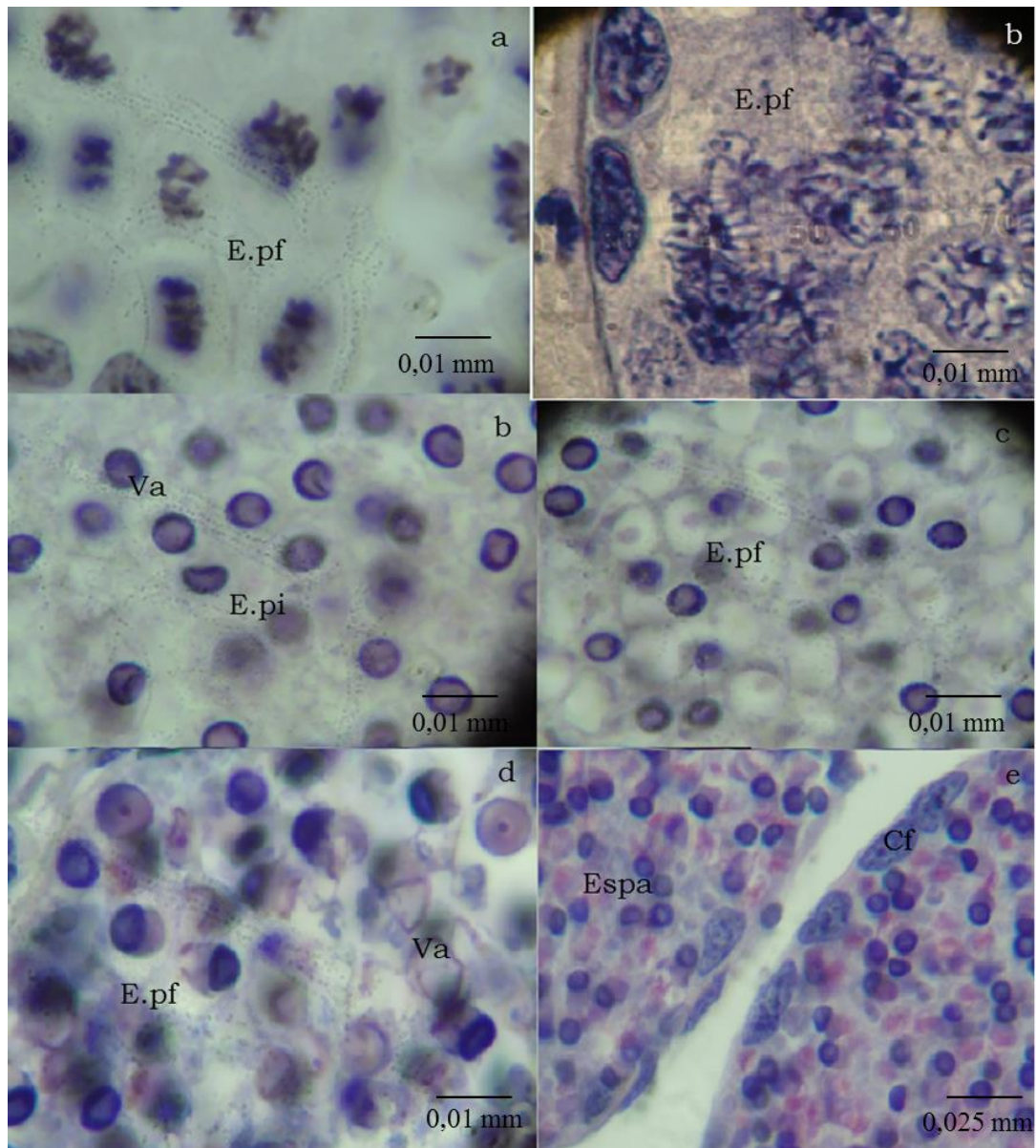


Figura 1.30. Espermatocitos de *Z. collastinensis*. E.pi = espermatozoido inicial. E.pf. espermatozoido final. Espa = espermátida. Va = vesícula acrosomática.

Los túbulos seminíferos del testículo en ambas especies, se comunican con el vaso deferente anterior (VDA) por un corto conducto colector, cuya morfología es similar a la del vaso deferente anterior en su parte proximal. Ambos tienen un epitelio columnar y la luz del tubo poco a poco va abriéndose en la parte media y posterior del VDA (Fig. 1.31).



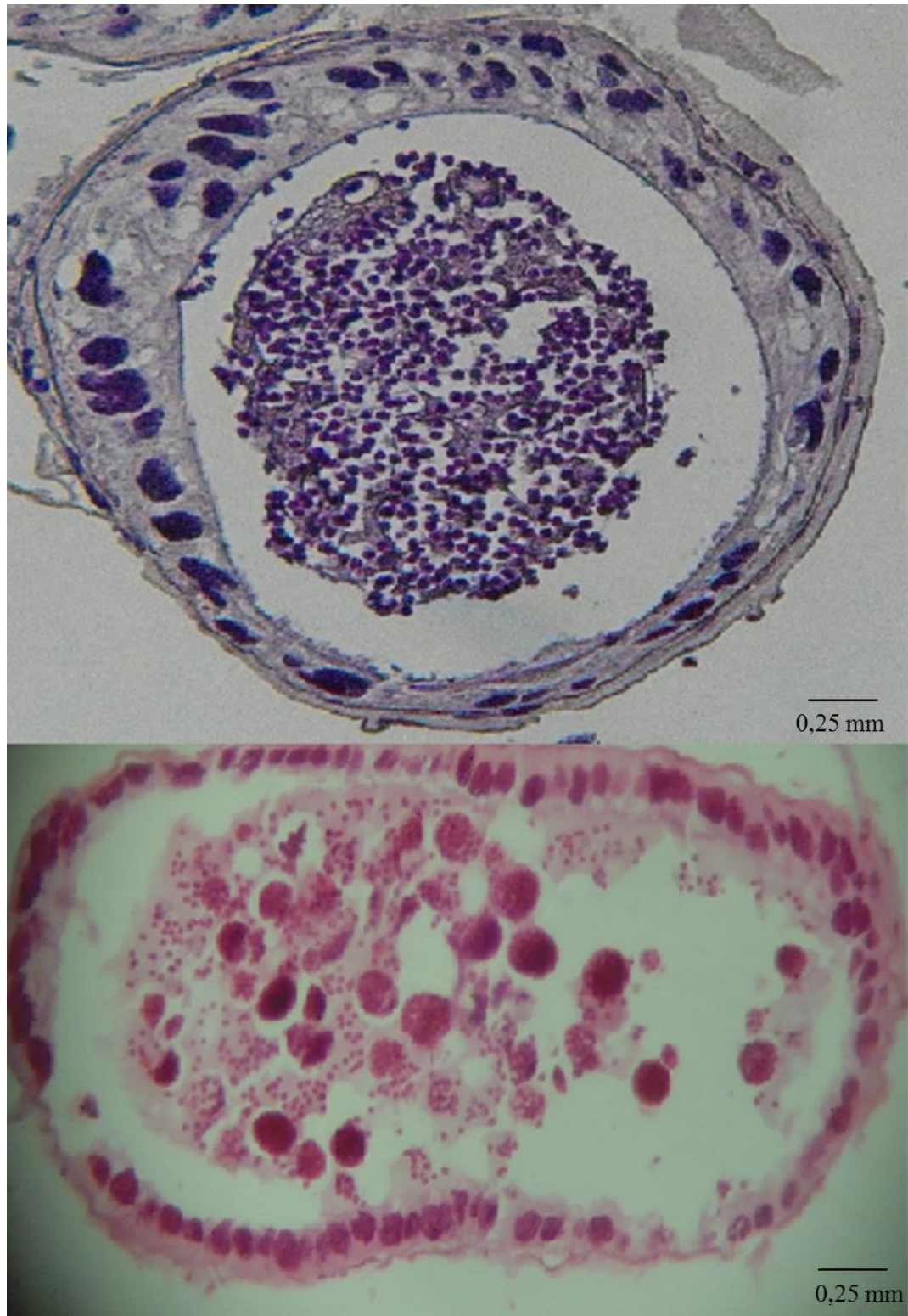


Figura 1.31. Vaso deferente anterior. a: *Z. collastinensis*. b: *D. pagei*.



En la parte posterior del VDA el epitelio columnar es multinucleado y aquí es donde los espermatozoides se agrupan formando un conglomerado de espermatozoides en forma de “racimo de uvas” que luego se encapsula en el VDM formando los espermatóforos (Fig. 1.32).

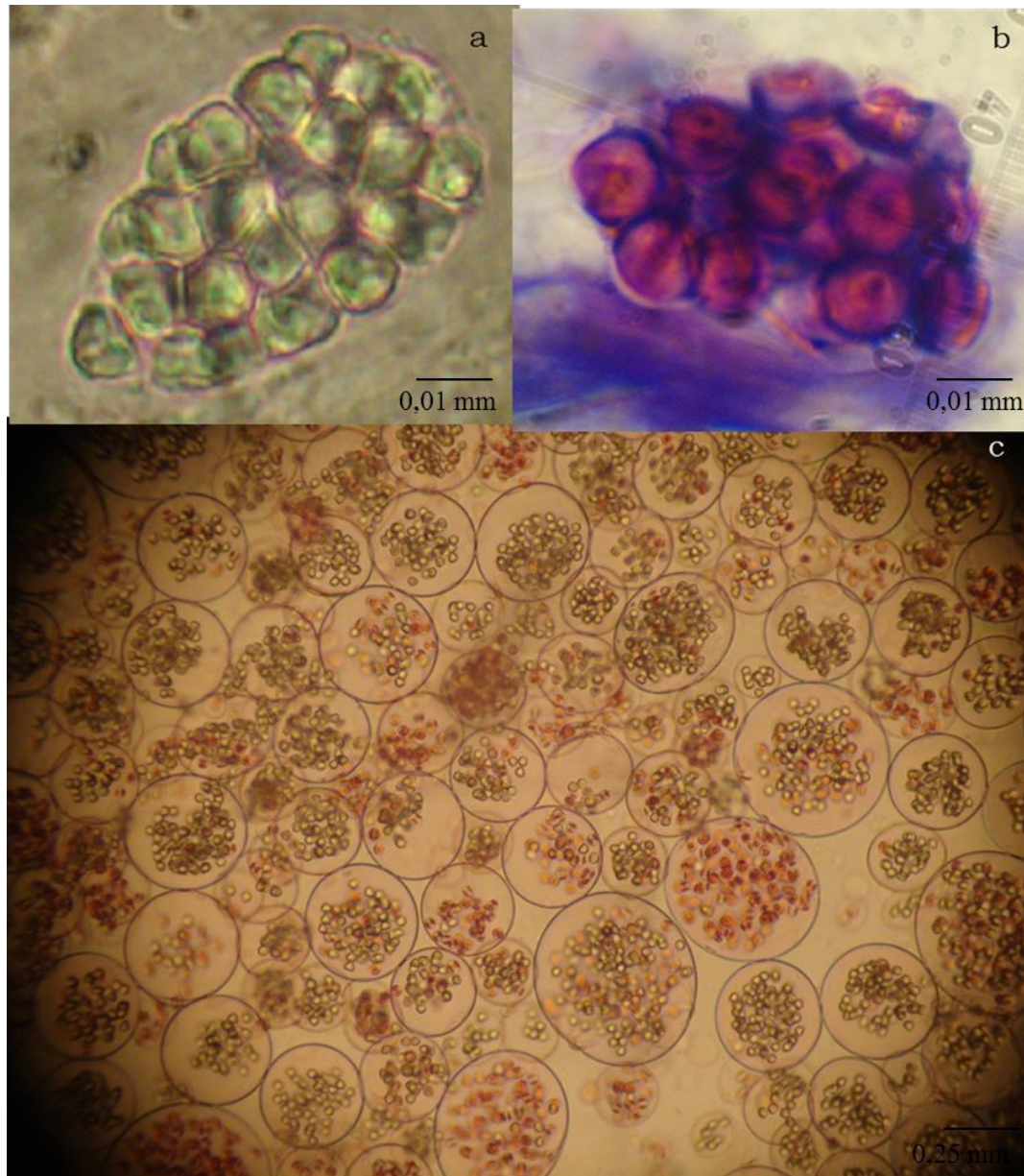


Figura 1.32. Espermatóforos de *Z. collastinensis*. a-b: Espermatozoides aglomerados en VDM listos para ser encapsulados en espermatóforos. c: espermatóforos.



Los espermátóforos tienen una única capa (Fig.1.32) que encierra un número variable de espermatozoides (1-95), siendo lo más habitual encontrar espermátóforos con 8 ± 5 en *Z. collastinensis* y en *D. pagei*. (Fig. 1.33).

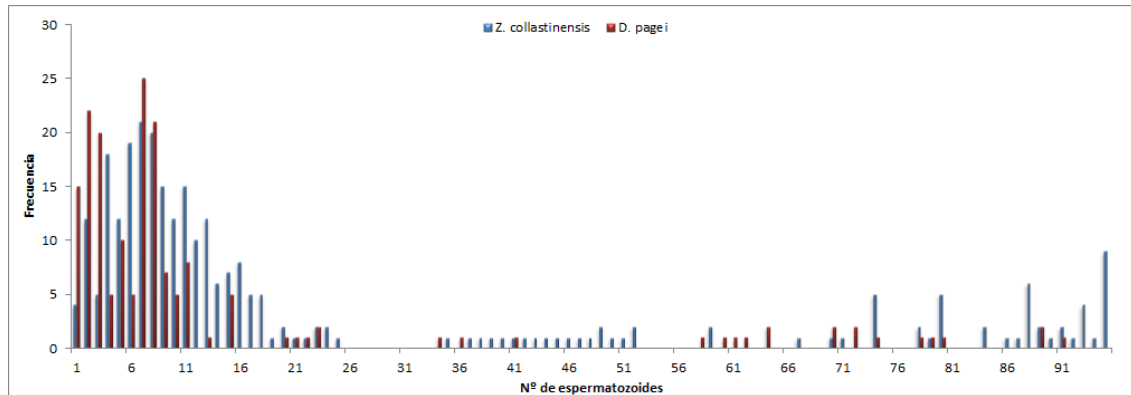


Figura 1.33. Número de espermatozoides presente dentro de espermátóforos de *Z. collastinensis* y *D. pagei*.

El vaso deferente medio (VDM) tiene epitelio columnar con núcleos basales y tejido conjuntivo rodeando el túbulo. En la luz se observan los espermátóforos formados y líquido seminal más abundante que en el VDA (Fig. 1.34).

El vaso deferente distal se divide en dos partes, una anterior que se diferencia del VDM por su pared con pronunciadas invaginaciones o embolsamientos de células columnares secretoras, las cuales se presentan multinucleadas con núcleos elongados y basales (Fig. 1.35).



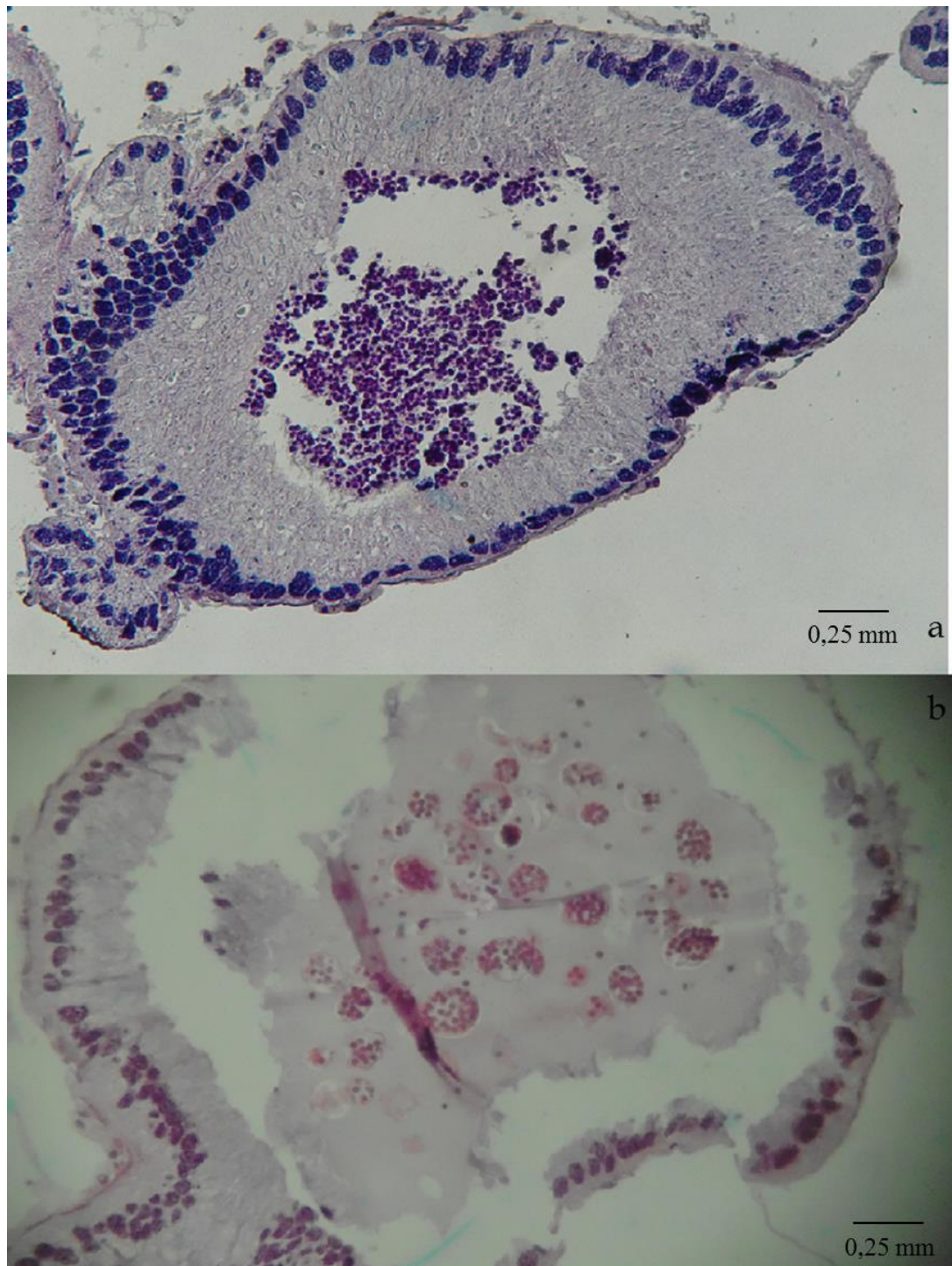


Figura 1.34. Vaso deferente medio. a: *Z. collastinensis*, b: *D. pagei*.



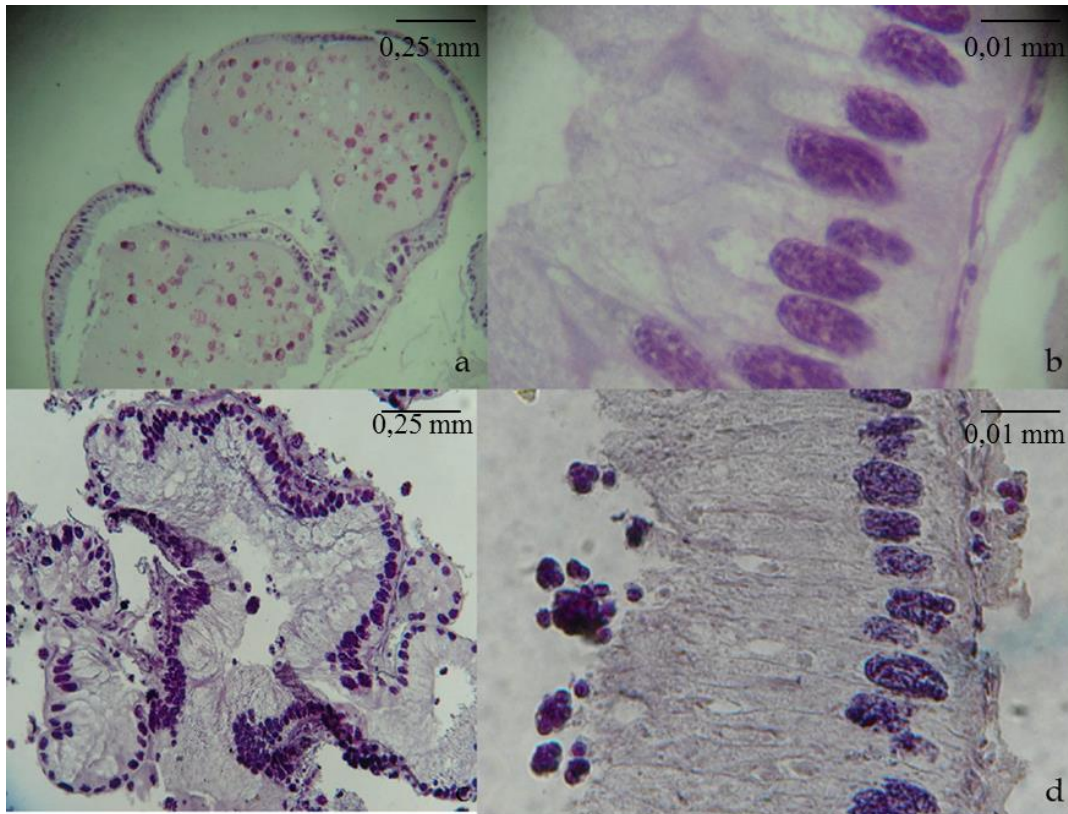


Figura 1.35. Vaso deferente distal (parte anterior) de *Dilocarcinus pagei* (a-b) y de *Z. collastinensis* (c-d). b y d, detalle de la pared, donde las células foliculares se encuentran elongadas y paralelas, con núcleos basales.

La parte posterior del VDD de *Z. collastinensis* y *D. pagei* es una estructura claramente diferente del resto del vaso deferente. En *Z. collastinensis* su color es amarillento translúcido con epitelio cuboidal, en cambio en *D. pagei* no toma color, siendo traslúcido pero de similar aspecto y estructura. La luz se observa con abundante líquido seminal, denso, homogéneo y sin presencia de espermátóforos. Su tinción es basófila en *Z. collastinensis* y acidófila en *D. pagei* (Fig. 1.36).

La figura 1.37 y 1.38 resume la información a cerca de la estructura del sistema reproductor masculino de *Z. collastinensis* y *D. pagei* respectivamente.



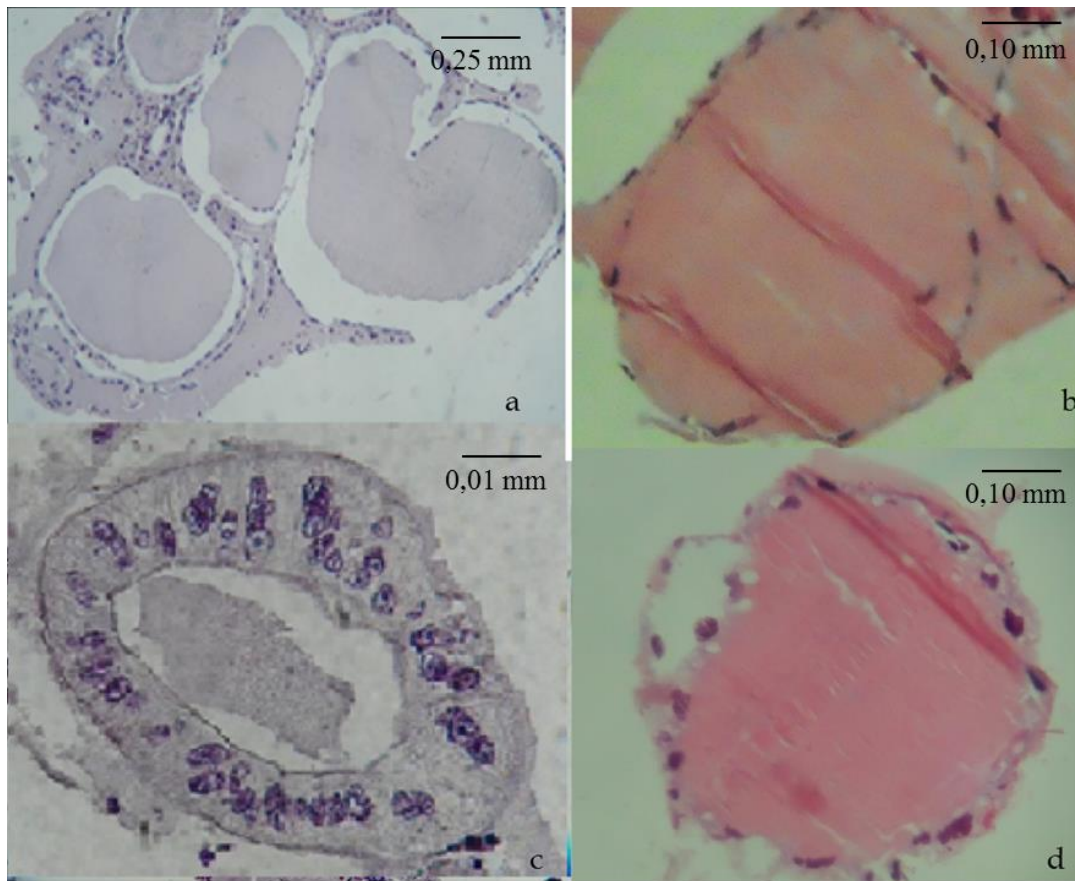


Figura 1.36. Vaso deferente distal (parte posterior). a y c en *Z. collastinensis*. b y d en *D. pagei*.



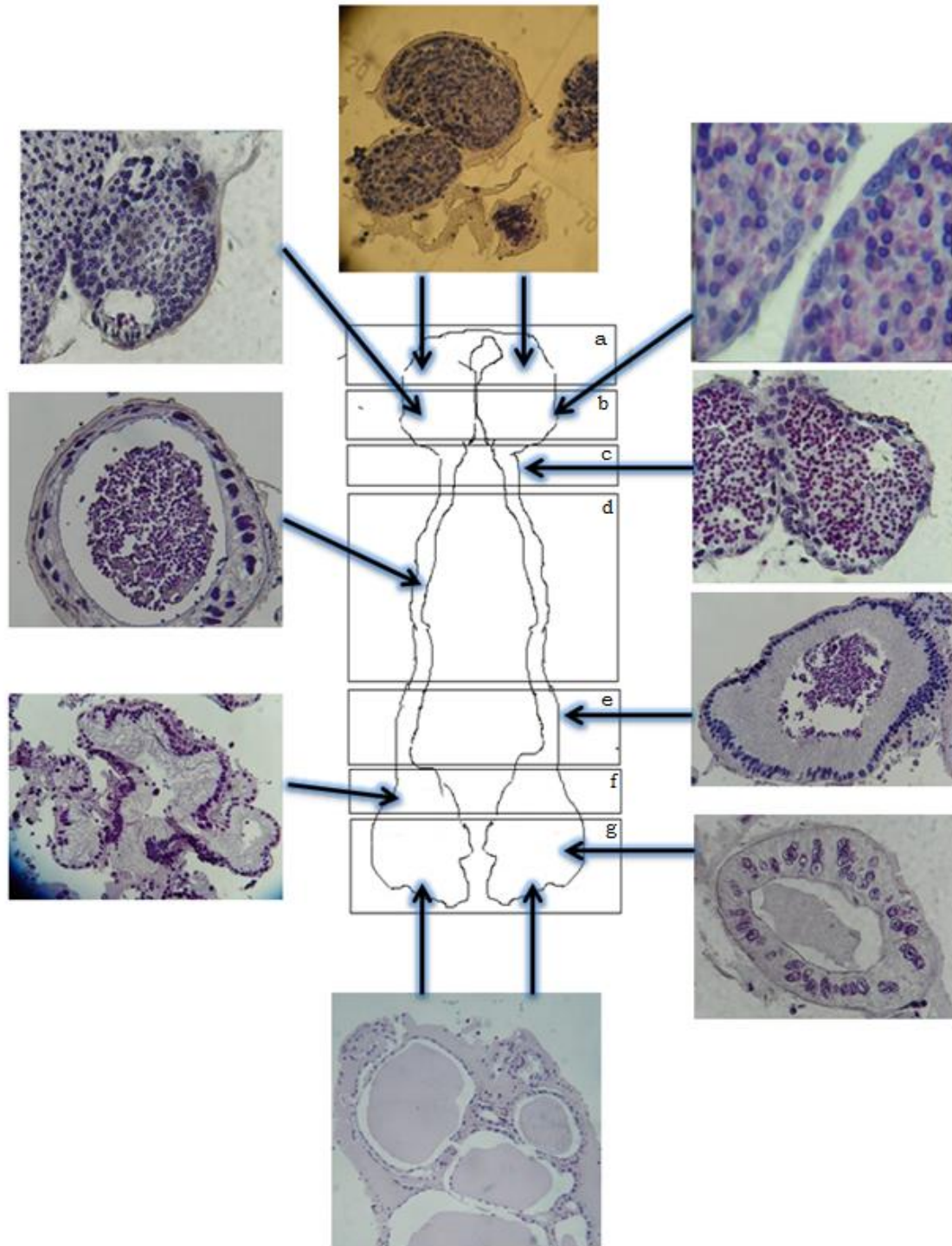


Figura 1.37. Sistema reproductor masculino maduro de *Zilchiopsis collastinensis*. a: testículo apical; b: testículo inferior; c: vaso deferente anterior; d: vaso deferente medio; e: vaso deferente distal anterior; f: vaso deferente distal posterior; g: vaso deferente distal-distal o vesícula seminal.



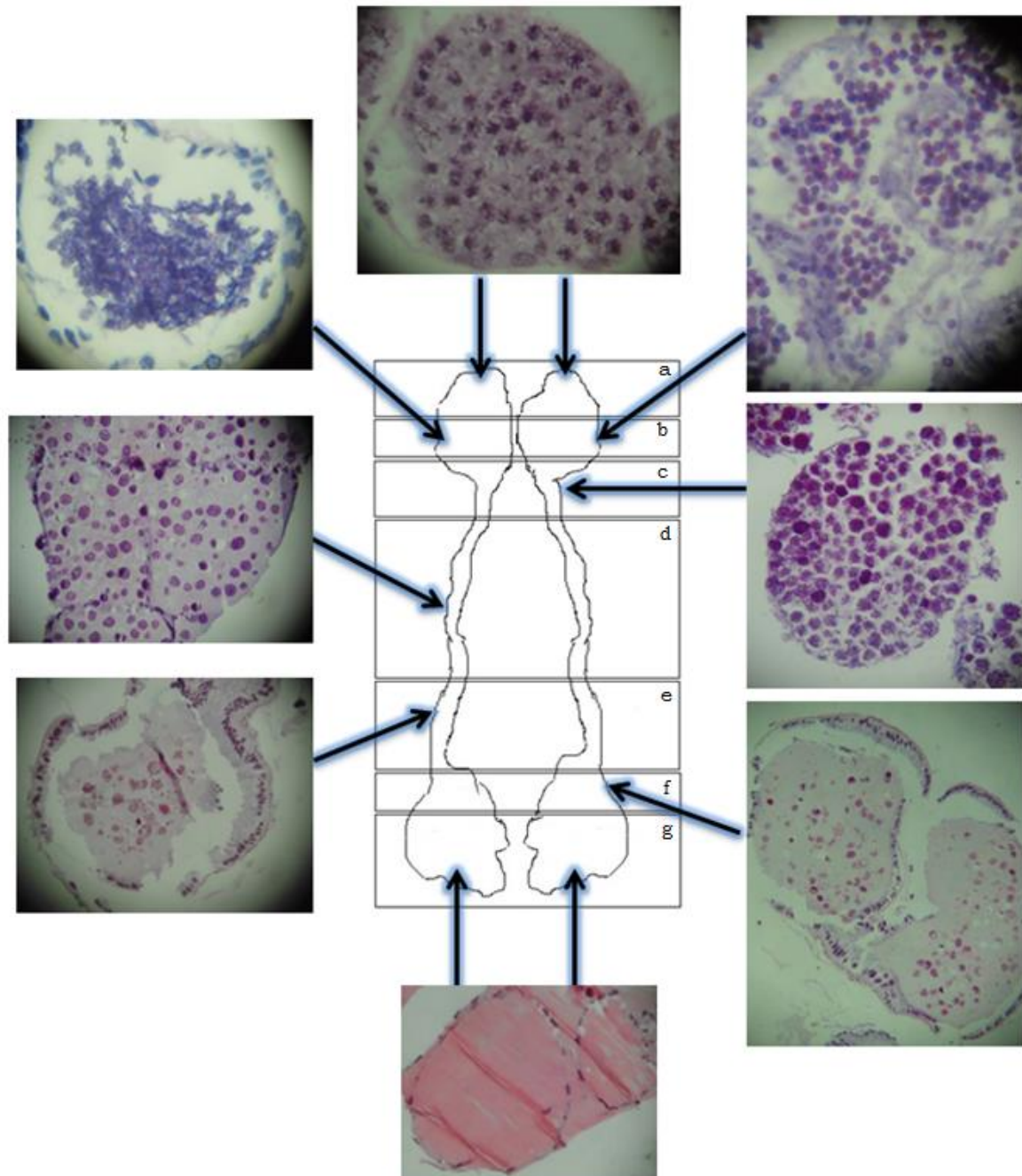


Figura 1.38. Sistema reproductor masculino maduro de *Dilocarcinus pagei*. a: testículo apical; b: testículo inferior; c: vaso deferente anterior; d: vaso deferente medio; e: vaso deferente distal anterior; f: vaso deferente distal posterior; g: vaso deferente distal-distal o vesícula seminal.



Discusión

Sistema reproductivo femenino

El inicio del período reproductivo es un evento crítico por el costo energético que la hembra debe destinar a su sistema reproductivo (López-Greco & Rodríguez, 1999). En los crustáceos decápodos las reservas del hepatopáncreas se utilizan por lo general durante el desarrollo ovárico (Pillay & Nair, 1973; Kyomo, 1988; Chu, 1995; López-Greco & Rodríguez, 1999; Yamaguchi, 2001; Tsukimura, 2001; Beatty *et al.*, 2005; Santhoshi *et al.*, 2009; Ferré *et al.*, 2009).

Del mismo modo se observó en *Z. collastinensis* donde los valores mínimos del IHP no alcanzó niveles críticos. No obstante se observó una correlación negativa entre el IG y el IHP, lo que podría indicar que cuando la gónada se encuentra en crecimiento, las reservas del hepatopácreas (HP) disminuyen por el envío de vitelogenina al ovario. Durante el período donde el ovario llega a su máximo tamaño, el HP se encuentra en su menor tamaño y el HP retoma su volumen normal durante el verano cuando comienza un nuevo ciclo ovárico.

Dado que los costos energéticos son altos en las hembras, y los valores mostrados en el IHP de *Z. collastinensis* no fluctúan mucho, podría pensarse que la energía requerida durante el desarrollo ovárico en esta especie proviene no solamente del HP. En algunos crustáceos existen sitios de síntesis de vitelogenina diferentes al HP, como son las células foliculares del ovario observado en *Procambarus clarkii* y *Callinectes sapidus* (Kulkarni *et al.*, 1991; Lee y Watson, 1995).

Por otro lado los valores más altos alcanzados por el IG fueron durante primavera-verano, observándose una marcada estacionalidad. Esto puede explicarse ya que durante estos meses al menos 50 % de las hembras de la población se observó ovígera. Luego durante el otoño-invierno el ovario de *Z. collastinensis* se encuentra en nuevo crecimiento, teniendo valores mínimos.



El sistema reproductivo de *Z. collastinensis* y *D. pagei* está formado por un único ovario, el cual tiene una forma inusual de “U” invertida, solo descrito para *Sylviocarcinus pictus* (Souza Da Silva, 2010), especie perteneciente a la misma familia. Es frecuente observar el ovario en forma de “H” como en *Cardisoma guanhum* (Molina, 1782), *Cancer setosus* (Goldstein & Enrique Dupré, 2010), *Uca uruguayensis* y *Neohelice granulata* (Rodríguez, 1991), o en “Y” como en *Procambarus clarkii* (Girard) (Ando & Makioka, 1998).

La posición del ovario es dorsal respecto al hepatopáncreas, comunicado con oviductos que se elongan formando receptáculos seminales y conductos genitales que desembocan en gonóporos pares ubicados en el quinto somito torácico (McLaughlin, 1983; López-Greco, 2013).

La pared del ovario observada en *Z. collastinensis* es similar a la descrita para los Brachyura observándose una capa de tejido conectivo, y una germinativa (Adiyodi & Soubraoniam, 1983; Bell & Lightner, 1988; Rodríguez, 1991). Algunas especies poseen además una pared muscular que rodea el ovario, pero generalmente está ausente (Krol *et al.*, 1992) al igual que en *Z. collastinensis*.

La luz del ovario de *Z. collastinensis*, como en la mayoría de los decápodos, no es evidente y queda solapado por oogonias y oocitos previtelogénicos (Krol *et al.*, 1992; Elorza & Dupré, 2000), que en diferentes grados de desarrollo rodean el *germarium*. Luego las oogonias se convierten en oocitos previtelogénicos con núcleos centrales y grandes nucléolos (Btowdy, 1989).

La internalización pronunciada del *germarium* en braquiuros (Adiyodi & Subramonian, 1983) se comprobó también en *Z. collastinensis*, donde los centros germinativos se encuentran dispersos a lo largo de un eje central de tejido en el ovario. De modo similar fue observado en *Portunus sanguinolensis*, *Callinectes sapidus*, *Cancer*



pagurus, *Menippe mercenaria*, *Rhithropanopeus harrissi*, *Portunus pelagicus*, *Uca uruguayensis*, *Chasmagnathus granulata*, *Procambarus clarkii* (Ryan, 1967; Johnson, 1980; Adiyodi & Subramonian, 1983; Rodriguez, 1991; López-Greco, 1997; Ando & Makioka, 1998). Sin embargo, en algunas especies de peneidos, la zona germinal se encuentra en posición intermedia y ventral de la pared del ovario (King, 1948; Bell y Lightner, 1988).

En *Z. collastinensis* y *D. pagei* la posición dorso-central de la zona germinal podría estar en relación con maximizar el espacio que van ocupando los oocitos en el ovario. Dado que los cangrejos tricodactílicos han invertido en un mayor tamaño del huevo (mayor cantidad de vitelo) que sus parientes marinos, y teniendo en cuenta la presión que ejercen éstos dentro del ovario, esta estrategia podría beneficiar el desplazamiento de los ovocitos primarios a las zonas de crecimiento más alejadas de la luz del ovario (Adiyodi & Subramonian, 1983).

En *Penaeus stylirostris* los oocitos de la zona germinal se convierten en oocitos previtelogénicos y estos oocitos en desarrollo migran a los márgenes de la subunidades del ovario porque estos se agrandan (Bell y Lightner, 1988). *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* no presentan un ovario compartimentado en subunidades; sin embargo, los oocitos previtelogénicos migran de igual forma a la periferia del ovario maximizando el espacio. Cabe destacar que cada folículo está constituido por un solo oocito con su capa de células foliculares y la membrana basal al igual que en *Jasus frontalis* (Elorza & Dupré, 2000). Ello difiere de lo que ocurre en *Penaeus setiferus*, *P. stylirostris* y *P. vannamei*, donde los folículos son una especie de “bolsa” con un lumen central donde se encuentran los oocitos. Dentro del folículo, los oocitos maduran desde el centro hacia la periferia y cada folículo se encuentra conectado en su zona media al lumen del ovario (King, 1948; Bell & Lightner, 1988).

El crecimiento de los oocitos implica el desarrollo de la célula



germinal antes de la vitelogénesis (Krol *et al.*, 1992). El desarrollo de estos se da de modo similar al descrito en otras especies marinas donde se observa una alta basofilia al comienzo de su desarrollo por la escasa presencia de vitelo y la alta tasa de transcripción y presencia de ARN en el citoplasma. La previtelogénesis en decápodos se caracteriza por un aumento en la actividad de los diversos orgánulos citoplasmáticos. La acumulación de los ribosomas y el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso dan lugar a elementos vesiculares (Charniaux-Cotton, 1980).

Fue registrada una variación en el tamaño y disposición de las células foliculares. Éstas se ubican de forma desordenada en la zona germinal y se reacomodan alrededor de cada oocito cuando éstos entran en previtelogénesis tardía para formar los folículos. En un comienzo las células foliculares son aplanadas y elongadas. Pero a medida que los oocitos crecen, tales células acompañan su crecimiento con un aumento de volumen. Cuando los oocitos son depositados en el abdomen, éstas células permanecen en el ovario de forma dispersa cumpliendo funciones de reabsorción oocitaria (Adiyodi & Subramonian, 1980; López-Greco, 1997).

Son muy discutidas las funciones de estas células, estimándose que participan en la producción de vitelo, la formación del corion en los huevos y la producción de hormonas (Adiyodi & Subramonian, 1980; Krol *et al.*, 1992; Pochon-Masson, 1994).

Los oocitos vitelogénicos se observan con tinción acidófila y estos van acumulando vitelo hasta el momento en que son extruidos. Cabe destacar que como el proceso de oogénesis es continuo, suelen observarse en una misma puesta de huevos oocitos en vitelogénesis I. Esto también fue observado por Elorza & Dupré (2000) en *Jasus frontalis*.

La oogénesis en crustáceos involucra dos procesos: proliferativo y diferenciativo. Durante la fase proliferativa en la zona germinal tiene



lugar un aumento del número de oogonias por mitosis. Luego, durante el período diferenciativo, los oocitos primarios derivan en oocitos secundarios que son transformados en la típica “célula huevo” (Adiyodi & Subramonian, 1983).

En la fase proliferativa, las oogonias son producidas por mitosis en la zona germinal a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. En la fase de diferenciación, los oocitos primarios derivados de las oogonias secundarias son desplazados hacia la zona de crecimiento, en la que inmediatamente entran en la profase meiótica (Adiyodi & Subramonian, 1983; Krol *et al.*, 1992). En ese momento se producen cambios nucleares y citoplasmáticos, el oocito aumenta de tamaño y los ovocitos alcanzan su posición final en el ovario (Adiyodi & Subramoniam, 1983). Cuando los oocitos maduran y se produce la ovulación, la división meiótica progresa a la metafase de la división de maduración primaria (Yano, 1983).

Sistema reproductivo masculino

El índice gonadosomático (IG) se observó con una fluctuación similar al del IHP, teniendo su máximo durante el otoño y su mínimo en verano, por lo que podría pensarse que la energía requerida por el SRM está dada por el HP. A pesar de esto, en ninguno de los dos el valor mínimo llega a ser menor a 50 % del valor máximo, por lo cual podría estimarse que el SRM se encuentra todo el año preparado para la transferencia de material genético. Además de la energía destinada al mantenimiento de la gónada cabe destacar que el comportamiento de cortejo, agonístico y de forrajeo también están presentes en el gasto energético.

La relación entre el IG y el desarrollo de la VDM es clara, encontrándose en su máximo desarrollo al alcanzar el máximo el índice respectivo. Esta relación puede explicarse ya que durante los meses de marzo-agosto se registraron el mayor número de cópulas en el ambiente natural (ver Capítulo 2).



El sistema reproductivo de *Z. collastinensis* y de *D. pagei* es similar al sistema descrito para los decápodos en general, teniendo una estructura pariada, formada por testículos lobulares (Johnson, 1980; Krol *et al.*, 1992; Sokolowicz *et al.*, 2007; Erkan *et al.*, 2009) unidos por una comisura de tejidos conjuntivo y vasos deferentes (Krol *et al.*, 1992). En *Z. collastinensis* se observó que el SRM tiene forma de “U” invertida, ya que la estructura pareada tiene una comisura en su extremo anterior uniendo ambos testículos. Esta configuración, no encontrada en otras especies, tampoco fue señalada para miembros de la misma familia como en el caso de *Sylviocarcinus pictus* (Souza Da Silva, 2010), donde se observó una estructura en forma de “H” o “V” como la mayoría de los decápodos (Krol *et al.*, 1992; Kronenberger *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2009; López-Greco, 2013).

Otra característica que distingue a *Z. collastinensis* y *D. pagei* es el lugar de formación de los espermátóforos ya que, a diferencia de lo que sucede en general en los decápodos, los espermátóforos se forman cuando los espermatozoides pasan del VDA al VDM. Al entrar al VDA los espermatozoides se rodean de una secreción que los aglutina y consolida la masa de esperma, que luego será envuelta por otra secreción formando los espermátóforos (Uma & Subramonian, 1984; Krol *et al.*, 1992; Subramonian, 1993) en el VD medio.

Los espermátóforos son estructuras cuya principal función es la protección durante la transferencia del esperma contra la desecación en ambientes iso-osmóticos o la excesiva entrada de agua en ambientes hiper-osmóticos. Sin embargo, no es ésta su única función, ya que además es una fuente de almacenamiento, protección y provee sustancias energéticas para su prolongada estancia en el cuerpo de la hembra (Subramonian, 1991; 1993).

Los decápodos tienen una gran variedad morfológica de los espermátóforos. En macruros, los espermátóforos son estructuras tubulares rodeadas de secreciones mucosas; en anomuros son generalmente pedunculados, consistiendo en una ámpula con la masa



de espermatozoides y un pedúnculo gelatinoso. En cangrejos braquiuros los espermatozoides son vesiculares o esféricos (Subramonian, 1991), tal como se presentan en *Z. collastinensis* y en *D. pagei*. Este tipo de espermatozoides también se observó en *Callinectes sapidus* (Cronin, 1947), *Libinia emerginata* y *L. dubai* (Hinsh & Walker, 1974), *Geryon fenneri* (Erdman & Blake, 1988), *Matuta lunaris* (Perez, 1990), *Chionoecetes opilio* (Beninger *et al.*, 1993; Elner & Beninger, 1995), *Metopograpsus messor* (Anilkumar *et al.*, 1999), *Chasmagnathus granulata* (López-Greco *et al.*, 1999), *Chionoecetes japonicas* (Yosho, 2000), *Uca lacteal* (Yamaguchi, 2001), *Arenaeus cribrarius* (Pinheiro & Fransozo, 2002), *Chaceon fenneri* (Hinsch, 2005), *Goniopsis cruentata* (Garcia & Silva, 2006; Pljaroen *et al.*, 2010),

El vaso deferente posterior en *Z. collastinensis* y en *D. pagei* presenta una estructura diferenciada en una zona anterior blanca, con paredes fuertemente plegada y gruesas y en su interior espermatozoides y líquido intersticial. Por otro lado, en su parte distal se observa una estructura translúcida, donde no se observaron espermatozoides, pero sí un lumen completamente cargado de una secreción amorfa, por lo que se propone como un reservorio energético y depósito de fluido para la inseminación. Las secreciones del VDA, VDM y VDD participan en la formación de los espermatozoides, también una secreción en el VDD que no se mezcla con el resto del semen podría cumplir funciones de “tapón espermático” durante la cópula (Subramonian, 1993).

En *Uca uruguayensis* (Cuartas & Petriella, 2010) y *Chionoecetes opilio* (Beninger *et al.*, 1988), el VDD presenta una estructura similar a la descrita para *Z. collastinensis*, donde se observa una estructura epitelial muy desarrollada y secretora sin presencia de espermatozoides. En tanto Diesel (1991) sostiene que el VDD produce y almacena plasma seminal, en cangrejos araña y otros braquiuros su porción final está particularmente desarrollada (Garcia & Silvia, 2006) al igual que en *Z. collastinensis* y en *D. pagei*.



Capítulo 2 – Comportamiento reproductivo

Introducción

La reproducción es un proceso que requiere la coordinación de procesos fisiológicos, conductuales y ecológicos que aseguren el éxito reproductivo. Las interacciones entre machos y hembras pueden ser complejas, generando en muchas ocasiones encuentros agonísticos antes, durante y después del apareamiento (Teytaud, 1971; Gleeson, 1980; Jivoff, 1997; Jivoff & Hines, 1998).

Las condiciones ambientales interaccionan entre sí e influyen en los individuos, actuando como estímulo, y determinando patrones de conducta y desarrollo (Begon, 1999). Así, por ejemplo, la temperatura y el fotoperiodo interactúan como señales que desencadenan los ciclos de muda y reproducción (Díaz *et al.*, 2003).

La distribución espacial y temporal de los cangrejos determinan la estructura de las poblaciones e influyen directamente en la reproducción (Hines *et al.*, 1987; Steele & Bert, 1994). Así el número de machos y hembras maduros sexualmente influye en las competencias por el acceso a parejas receptivas (Emlen & Oring, 1977, Borgia, 1979), por lo cual la incorporación de nuevos individuos a la población reproductiva es clave en el mantenimiento de las poblaciones locales (Oliveira de Moura & Coelho, 2004).

Las interacciones agonísticas definen el uso de los recursos, tanto en aspectos espaciales como la adquisición de refugios (Volpato & Hoshino, 1984; Peeke *et al.*, 1995), la optimización de los recursos tróficos (Hazlett *et al.*, 1975; Stocker & Huber, 2001) y lograr reuniones exitosas entre hembras y machos maduros (Bovbjerg, 1953; Morre, 2007; Warren *et al.*, 2009). Por lo tanto los animales dominantes logran mantener su *fitness* a través del desarrollo de actividades reproductivas exitosas (Wilson, 1975; Moore, 2007).



En los decápodos, la agregación espacial, movimientos rituales, las diferencias en tamaño de quelípedo, e información sensorial son algunos de los principales factores que influyen en el comportamiento agonístico (Dingle, 1983; Garvey & Stein, 1993; Rutherford *et al.*, 1995; Schroeder & Huber, 2001; Zulandt-Schneider *et al.*, 2001; Lammers *et al.*, 2009). El tamaño de los cangrejos es un elemento influyente en las interacciones agonísticas (Francis, 1988; Figler *et al.*, 1999). Además, estas acciones en animales de diferente tamaño, varía en intensidad (Huber, 1987) dependiendo de la condición de los individuos subordinados y dominantes (Zulandt-Schneider *et al.*, 2001). A ello se suma que el tiempo de permanencia en el lugar, la historia de la lucha anterior y la capacidad de lucha adquirida, afectan el desarrollo de cada luchador en combate (Parker, 1974; Bergman & Moore, 2003).

En Brachyura el apareamiento es un fenómeno cuyas causas pueden residir en la madurez del individuo y en su etapa en el ciclo de muda (Hartnoll, 1969). En la mayoría de los cangrejos existe una muda puberal que implica cambios estructurales observables macroscópicamente. En las hembras el abdomen y pleópodos aumentan de tamaño, siendo éste indicador de la madurez en las mismas (Hartnoll, 1969; Taddei, 1999), éste evento tiene como función la ampliación de la superficie abdominal, donde se cumplirán funciones de incubación de los huevos y cuidado de las crías. En machos, luego de la muda puberal se desarrollan el primer par de pleópodos que funciona como órgano copulador, como también puede haber un aumento en el tamaño del quelípedo, importante durante el cortejo, comportamientos agonísticos y eventos reproductivos (Hartnoll, 1965, 1974; Conan & Comeau, 1986; Gherardi & Micheli, 1989; López-Greco, 1997).

Los machos de cangrejos copulan sólo mientras están en la condición de intermuda (Hartnoll, 1969; López-Greco, 1997). En la mayoría de las hembras la estructura de la vulva y la vagina no ofrecen ningún obstáculo en el apareamiento durante cualquier parte del ciclo de muda. Las excepciones son aquellas especies en las que la vulva



normalmente se cierra por opérculos calcificados inmóviles y que pueden copular solamente durante periodos en que el opérculo se vuelve flexible (Hartnoll, 1969).

En cangrejos tricodactílicos, el patrón de cortejo y cópula no ha sido estudiado, pero sí en otros cangrejos de agua dulce como *Geotelpusa dehaani*, *Spiralothelphusa hydrodroma*, *Potamon potamios palestinensis* y *Potamon fluviatile*, para los cuales se describieron tanto estos comportamientos como los de desove, cuidados parentales y eclosión (Andrews, 1916; Mason, 1970; Ingle & Thomas, 1974; Barki & Karplus, 1999; López-Greco *et al.*, 2004; Almerão *et al.*, 2010). Sin embargo, los comportamientos de cortejo observados en estas especies coinciden en que hay una interacción agresiva, donde el macho toma a la hembra con los quelípedos y la manipula hasta quedar enfrentados colocando su abdomen bajo el de la hembra (Minei, 1976; Adiyodi, 1988; Gherardi & Micheli, 1989; Micheli *et al.*, 1990).




Los cangrejos tricodactílicos viven en un ambiente inestable respecto a su condición ancestral marina, dado que el río presenta fases de inundación y sequía. Estas variaciones resultan en un amplio rango de conectividad hidrológica entre aguas lólicas y lénticas que produce un intercambio de sedimentos, materia orgánica y organismos. La hidrología de los lagos de llanura de inundación, así como los procesos de sedimentación y resuspensión, y las variaciones en el contenido de calor están estrechamente relacionadas con la inundación y las fases de sequía (Drago, 2007). En razón de estas condiciones ambientales oscilantes, los cangrejos tricodactílicos podrían tener un compromiso mayor en la inversión materna, representada por cuidados parentales prolongados, reducción del número de huevos con aumento del tamaño (mayor cantidad de vitelo) y desarrollo directo. Esto se refleja en una disminución de la descendencia respecto a los marinos, pero con eclosión de individuos totalmente desarrollados sin estadios larvales libres.



Generalmente después de la eclosión, la atención materna en los decápodos se restringe a los cangrejos y langostas de agua dulce (Liu & Li, 2000). En la familia Trichodactylidae, fue descrita en *Trichodactylus fluviatilis* (Alarcón *et al.*, 2002), *Sylviocarcinus australis* (Magalhães & Türkay, 1996; Mansur & Hebling, 2002) y *Sylviocarcinus pictus* (Sant'Anna *et al.* 2013); también en otras familias de cangrejos de agua dulce, tales como potamoideos (Gherardi *et al.*, 1988; Micheli *et al.*, 1990; Cumberlidge, 1999; Wehrtmann *et al.*, 2010), *Geosesarma notophorum* (Ng & Tan, 1995). En anomuros del género *Aegla* también se observó el cuidado materno, por ejemplo en *A. perobae* (Hebling & Rodrigues, 1978), *A. prado* (Schmitt, 1942; Bond-Buckup *et al.*, 1996), *A. violacea* (Bond-Buckup & Buckup, 1994; Bueno & Bond-Buckup, 1996) y *A. uruguayana* (López-Greco *et al.*, 2004).

Otros aspectos conductuales fueron observados para la familia Trichodactylidae, como en el caso de *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* (Renzulli & Collins, 2001) y *Trichodactylus panoplus* (Zimmermann *et al.*, 2009).

Este capítulo tiene como objetivos:

-  Describir el comportamiento agonístico de machos de *Dilocarcinus pagei* y *Zilchiopsis collastinensis*.
-  Describir el comportamiento de cortejo, cópula y desove de *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *Trichodactylus borellianus*.
-  Describir el tipo de cuidado maternal y sus características en *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *T. borellianus*.



Materiales y métodos

Comportamiento agonístico

El comportamiento agonístico de *Z. collastinensis* y *D. pagei* se analizó en condiciones de laboratorio.

Para los ensayos se utilizaron cangrejos machos con tallas reproductivas de *Z. collastinensis* y *D. pagei* (Tabla 2.1). Estos cangrejos fueron recolectados durante el período 2010-2012 mencionado en la metodología general.

Tabla 2.1. Talla reproductiva de *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* utilizados en los ensayos de comportamiento agonístico.

Especie	N	Rango de tallas (mm)
<i>Z. collastinensis</i>	30	54–61
<i>D. pagei</i>	30	43–50

Se completaron quince encuentros agonísticos de cada especie. Para cada uno fue acondicionado el acuario con agua nueva para evitar la presencia de sustancias que pudieran influir en el comportamiento y aumentar la agresión.

La interacción se dividió en tres categorías: pre-pelea, pelea y post-pelea. Cada etapa se identificó por la presencia de diferentes acciones. Cada acción y tiempo correspondiente se registró en forma digital con una cámara Sony H9, y la película se analizó digitalmente para evaluar el patrón de movimiento. El tiempo transcurrido de cada encuentro fue de 60 minutos para evitar lesiones extremas.

El tiempo empleado en cada acción y ambos ensayos se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, en tanto las diferencias se analizaron mediante post-test de Mann Whitney.



Cortejo y cópula

En el laboratorio se evaluó el patrón de comportamiento de cortejo y cópula en *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *T. borellianus*.

Las observaciones -tanto en el ambiente natural como en el laboratorio- fueron realizadas durante el período comprendido entre enero 2011 y febrero 2012, según se describe en la sección general de Materiales y métodos.

Las observaciones de campo se realizaron teniendo en cuenta el lugar donde se desarrollaron las cópulas, el tiempo de duración y las tallas de los participantes.

Los ensayos se llevaron a cabo con cangrejos maduros sexualmente, con todos sus pereiópodos y quelípedos, siempre con el cefalotórax duro (en relación con el estado de muda). Las tallas utilizadas lo fueron de acuerdo con los datos de madurez sexual obtenidos en el primer capítulo. En *T. borellianus* se utilizó la talla mínima de hembras ovígeras utilizadas en ensayos de consumo de oxígeno (ver Capítulo 3) como medida de mínima talla reproductiva (Tabla 2.2).

Los cangrejos utilizados en los ensayos fueron transportados al laboratorio de bioensayos del Instituto de Limnología, donde se los mantuvo de forma individual durante una semana en acuarios a 22 ± 2 °C y un fotoperíodo de 12:12 con refugios y una planta acuática (*Eichhornia crassipes*). Cada día los animales fueron alimentados con músculo de pescado, eliminando el sobrante anterior y haciendo recambios de 1/3 de agua del total del acuario cada tres días.



Tabla 2.2. Rango de tallas y número de individuos de *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* utilizados en los ensayos de laboratorio de cortejo y cópula.

Especie	Rango de tallas (mm)	
	Hembras	Machos
<i>Z. collastinensis</i>	(N = 20) 51–58	(N = 20) 54–61
<i>D. pagei</i>	(N = 12) 48–55	(N = 15) 43–50
<i>T. borellianus</i>	(N = 20) 9–13	(N = 20) 9–11

Para los ensayos de cortejo y cópula, por cada observación, se colocó un macho y una hembra de la misma especie, en acuarios de 72 litros de capacidad, de 30 cm de ancho, 60 cm de largo y 40 cm de alto y sin refugios.

Las observaciones de ensayos de cortejo y cópula permitieron definir las etapas de pre-cópula, cópula y post-cópula, como también los patrones de movimiento que ocurre en cada etapa y el tiempo utilizado en cada caso. El punto final del ensayo fue definido cuando se separaron ambos cangrejos.

La pré-cópula fue establecida desde el momento en que tiene lugar interacción entre los cangrejos. Este momento está caracterizado por los toques con los pereiópodos o quelípedos, acercamientos con persecución, la toma de la hembra por parte del macho, hasta el acople.

La cópula propiamente dicha, se definió desde el acople, momento en el cual se observan ambos cangrejos enfrentando sus abdómenes y la ubicación de los pleópodos masculinos en los gonóporos femeninos, hasta el momento en el que el macho suelta a la hembra.

La post-cópula fue el momento donde ambos cangrejos se separan y un período de 10 minutos posterior durante el que se observa si hay



una nueva interacción.

Los ensayos de cortejo y cópula se realizaron durante todo el año, observando variaciones estacionales respecto a la presencia o no de cópula.

Desove y cuidado maternal

Los ensayos de desove se realizaron utilizando hembras de tallas reproductivas de *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *T. borellianus*. Cada hembra se mantuvo aislada en acuarios de 72 litros de capacidad, equipado con rocas sobrepasando el nivel del agua y una planta acuática (*E. crassipes*) (Fig. 2.1).

Cada día se verificó el estado de las hembras hasta observarlas ovígeras. A partir de dicho momento se controló el tiempo de incubación y de cuidado maternal.

Diariamente se revisaron las hembras para definir el fin de la incubación y el tiempo de cuidado maternal. El control diario de las hembras fue realizado con extremo cuidado y de forma rápida, abriendo el abdomen un centímetro y extrayendo entre dos y tres huevos por semana con pincel. Cada extracción de huevos fue de una hembra diferente para disminuir el estrés.



El comportamiento de las hembras y de los juveniles fue observado en el mismo recipiente de eclosión una vez al día. Con el propósito de disminuir el estrés, el control fue realizado filmando durante 30 minutos cada hembra de forma alternada cada día.

A través de las filmaciones se determinaron los movimientos de ventilación realizados por las hembras, limpieza de la masa de huevos y juveniles, como también los movimientos realizados por los pequeños cangrejos luego de la eclosión.



Figura 2.1. Acuario acondicionado con rocas y plantas acuáticas durante los ensayos de desove y cuidado maternal. P.E: roca. C: cueva. P.A: planta acuática. R: refugio.



Resultados

Comportamiento agonístico

Durante el periodo de adaptación, la supervivencia fue de 100 %. Sin embargo, luego de los ensayos hubo mortalidad, aunque baja (8 %) y algunas pérdidas de quelípedos o pereiópodos.

Los momentos dentro de los ensayos fueron separados en tres categorías (es decir, pre-pelea, pelea y post-pelea después de la pelea) con fases discretas en cada uno (Fig. 2.2).

Cuando los animales reconocen la presencia de otro macho comienza la pre-pelea (Fig. 2.2). En esta categoría, las acciones fueron separadas en tres fases (es decir: reconocimiento, ataques y danza). Para cangrejos de ambas especies la categoría inicial se mantuvo similar los ensayos. Los cangrejos se tocaban con sus quelípedos y pereiópodos. Después se acercaban, y enfrentados se movían de lado a lado. La danza consiste en movimientos armónicos y sincronizados donde los animales miden el tamaño, fuerza, dureza y altura del oponente con los quelípedos. En el fin de esta categoría se definió dos posibles acciones: sumisión o pelea.

La pelea tuvo dos acciones consecutivas (Fig. 2.2): una pelea en combate cuerpo a cuerpo con los quelípedos, y un revolcón lateral tomados por los pereiópodos. Durante la pelea los oponentes se mantienen tomados con los quelípedos y pereiópodos. Estas acciones presentan varias oportunidades para que uno o ambos cangrejos pierdan el equilibrio y caigan rodando por el sustrato. Durante el abrazo, el cangrejo dominante utiliza quelípedos y pereiópodos para presionar en la parte ventral del caparazón del otro cangrejo. El cangrejo atrapado en este abrazo movió erráticamente sus pereiópodos. Este comportamiento solo se observó en *Z. collastinensis*.



En los casos donde no hubo abrazo, los dos cangrejos terminaron la pelea y la recuperación se inició en la post-pelea, la cual carece de cualquier comportamiento agonístico (Tabla 1). Posterior a la pelea, el perdedor evita el encuentro o participación en una nueva lucha (Fig. 2.2).

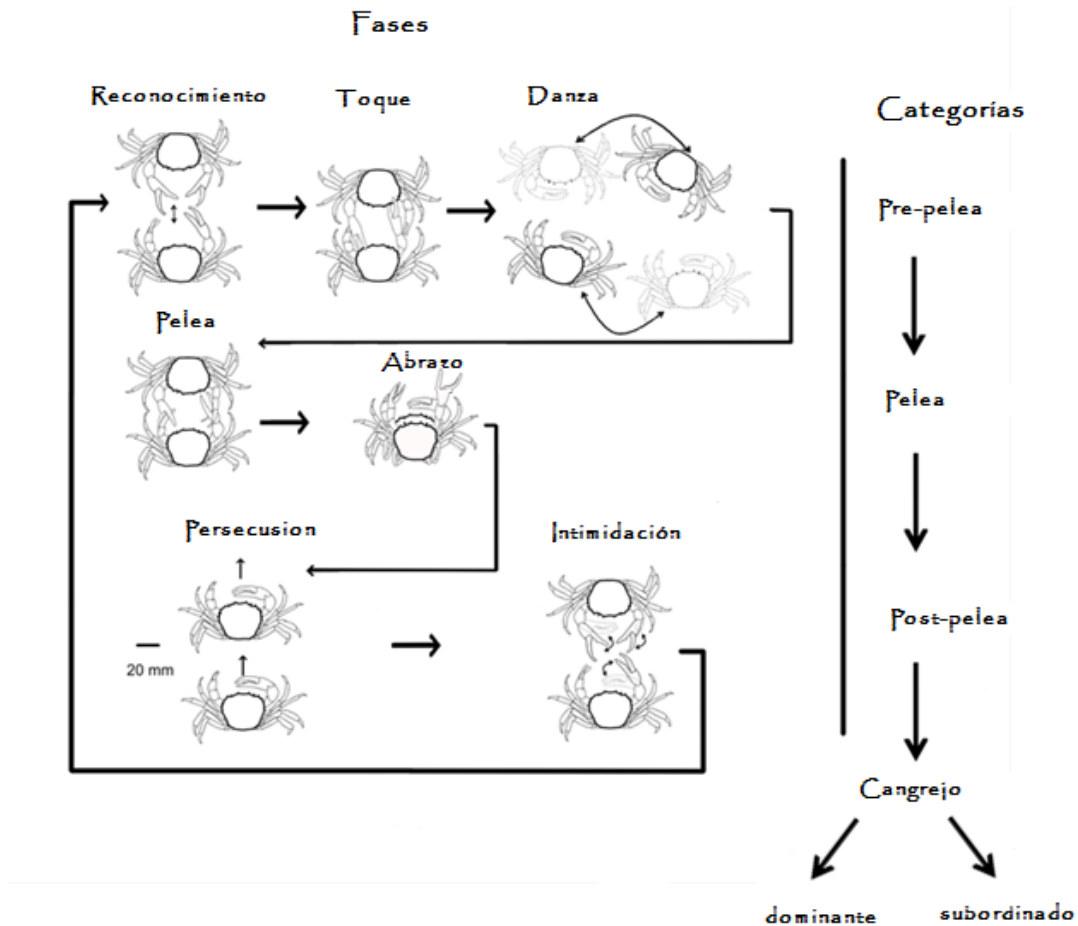


Figura 2.2. Descripción de los movimientos durante los encuentros agonísticos de *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* con sus correspondientes categorías.



Cortejo y cópula

El patrón de cortejo observado en *Z. collastinensis* y *T. borellianus* fue similar. *Dilocarcinus pagei* mostró un comportamiento diferente al resto de las especies estudiadas ya que las hembras, al producirse el encuentro, realizaron movimientos erráticos con los pereiópodos hasta el acoplamiento.

El cortejo fue corto en las tres especies (Tabla 2.3), consistiendo en una serie de movimientos donde el macho identifica a la hembra, se acerca y la toma de uno o varios pereiópodos.

Tabla 2.3. Duración en minutos (mínimos y máximos) del cortejo y cópula en *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus*.


Especie	Cortejo	Cópula
<i>Z. collastinensis</i>	15 – 40	300 – 960
<i>D. pagei</i>	5 – 15	50 – 65
<i>T. borellianus</i>	5 - 10	50 – 90


Las cópulas fueron registradas tanto en el laboratorio como en el ambiente natural y se realizaron con el cefalotórax “en duro”.


En las tres especies se observó un patrón de conducta agresivo durante el cortejo y cópula, en donde el macho tiene el control del evento reproductivo y la hembra se limita a la participación pasiva, teniendo una ubicación inferior respecto al macho (Fig. 2.3).

En las tres especies el patrón de movimientos durante la cópula fue similar, siguiendo la secuencia que se describe a continuación:



 El macho, sin soltar a la hembra, la gira hasta conseguir la posición donde las superficies ventrales entran en contacto. Encontrándose el macho siempre sobre la hembra, se lleva a cabo, el acoplamiento en esta posición.

 El macho ayuda a abrir el abdomen de la hembra con sus pereiópodos e inserta los gonópodos en los genitales femeninos.

 En esta posición, la hembra mantiene sus quelípedos con las puntas horizontalmente hacia adentro, mientras que el macho permanece con los quelípedos hacia abajo reteniendo a la hembra.

Después del apareamiento, el macho libera a la hembra y se separan. No se observó ninguna interacción posterior.





Figura 2.3. Cortejo y cópula en *D. pagei*. A-D: el macho identifica a la hembra y la toma de los pereiópodos. E, F: el macho abraza a la hembra y la acomoda hasta obtener la posición de cópula. G, H: el macho asiste a la hembra en la apertura del abdomen. I, J: el macho inserta los pleópodos en los genitales femeninos. La flecha indica el pleópodo en posición. K: durante la cópula, la hembra mantiene sus quelípedos con las puntas hacia adentro y horizontalmente y el macho permanece con los quelípedos con sus puntas hacia abajo.



En *Z. collastinensis* se observaron 13 cópulas distribuidas durante los meses de abril a octubre (Fig. 2.4), durando entre 5 y 16 horas (Tabla 2.3). Del total de cópulas observadas tres fueron en el ambiente durante el mes de julio.

En *D. pagei* se observaron 12 cópulas distribuidas durante los meses de enero a agosto (Fig. 2.4), durando entre 50 y 65 minutos (Tabla 2.3). Del total de cópulas observadas, dos fueron en el ambiente en el mes de mayo.

En *T. borellianus* se observaron 20 cópulas distribuidas en todo el año (Fig. 2.4), durando entre 50 y 90 minutos (Tabla 2.3), todas en condiciones de laboratorio.

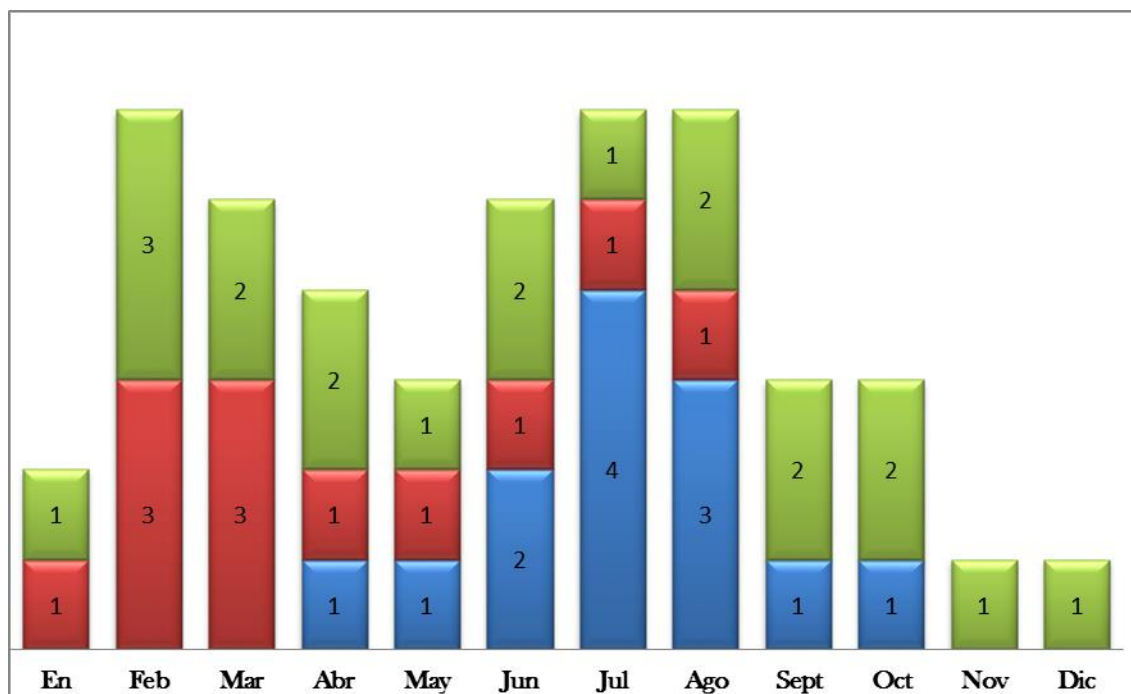


Figura 2.4. Distribución de las observaciones de cópulas según el mes del año, en *Z. collastinensis* (azul), *D. pagei* (rojo) y *T. borellianus* (verde). Los números representan la cantidad de cópulas observadas en cada mes para cada especie.



Desove y cuidado maternal

Inmediatamente luego de la bajada de huevos al abdomen se observaron a las hembras de *D. pagei*, *Z. collastinensis* y *T. borellianus* fuera del agua. Durante las observaciones en el ambiente natural y en el laboratorio, se advirtió que las hembras ovígeras se encontraban fuera del agua durante el período en que bajan sus huevos al abdomen, y se mantuvieron allí al menos durante las primeras horas antes de sumergirse (Fig. 2.5).

Por lo general durante la incubación *Zilchiopsis collastinensis* se mantiene en su cueva, la que cierra con un tapón de barro y vegetación (Fig. 2.6). Sin embargo, fue observado un gran número de hembras ovígeras fuera de éstas durante un muestreo en el mes de diciembre de 2012. En el caso de *T. borellianus* y *D. pagei* se encontraron hembras ovígeras siempre sobre plantas acuáticas.

Durante el período de incubación se observó una frecuencia significativamente mayor ($P = 0.41$) de ovígeras fuera del agua que sumergidas 43:26 respectivamente, por parte de las hembras de las tres especies. Sin embargo, no hubo preferencia respecto al sustrato a utilizar para salir del agua. En efecto: las hembras se encontraban por momentos sobre las piedras y en otros sobre las plantas suministradas.





Figura 2.5. Hembras ovígeras de *Z. collastinensis* (columna izquierda) y *D. pagei* (columna derecha) fuera del agua, durante el desove e incubación.



Figura 2.6. Cuevas cerradas por hembras de *Z. collastinensis* con barro y restos de plantas acuáticas. Las flechas indican la entrada.



En las tres especies se observó la pérdida de la masa de huevos en los casos en que momentos después de bajar los huevos al abdomen se sumergieron al agua (N = 2 en *D. pagei*, N = 3 en *Z. collastinensis* y N = 2 en *T. borellianus*), como también en otros momentos del desarrollo embrionario en *Z. collastinensis* (N = 7).

Este comportamiento de mantenerse fuera del agua, concluyó con la eclosión de las primeras crías. A partir de ese momento no se observó ninguna hembra fuera del agua, al menos hasta que las últimas crías habían abandonado el abdomen materno.

El tiempo de incubación en condiciones de laboratorio fue entre 46-62 días en *D. pagei*, 37-41 en *Z. collastinensis* y 8-12 días en *T. borellianus* (Tabla 2.4).

Cabe destacar que los huevos de *Z. collastinensis* y *D. pagei* no están pegados o fijados a los pleópodos de la hembra, como sí ocurre en la mayoría de los huevos de *T. borellianus* (Fig. 2.6). Sin embargo, se observó cohesión entre ellos dentro del abdomen materno y fuera de él cuando no se encontraban sumergidos en agua. La estructura del abdomen de *Z. collastinensis* y *D. pagei*, junto con los pleópodos, forma una especie de “cámara incubadora” donde los huevos permanecen durante la incubación.

Tabla 2.4. Tiempos utilizados por *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus* en la incubación, eclosión y cuidado maternal (post-eclosión) en días.

Especie	incubación	eclosión	cuidado	Tiempo
			maternal	total
<i>Z. collastinensis</i>	37-41	3 - 6	27 - 33	67- 80
<i>D. pagei</i>	46-62	3 - 6	30 - 38	79-106
<i>T. borellianus</i>	8-12	0	8 - 12	16 -24



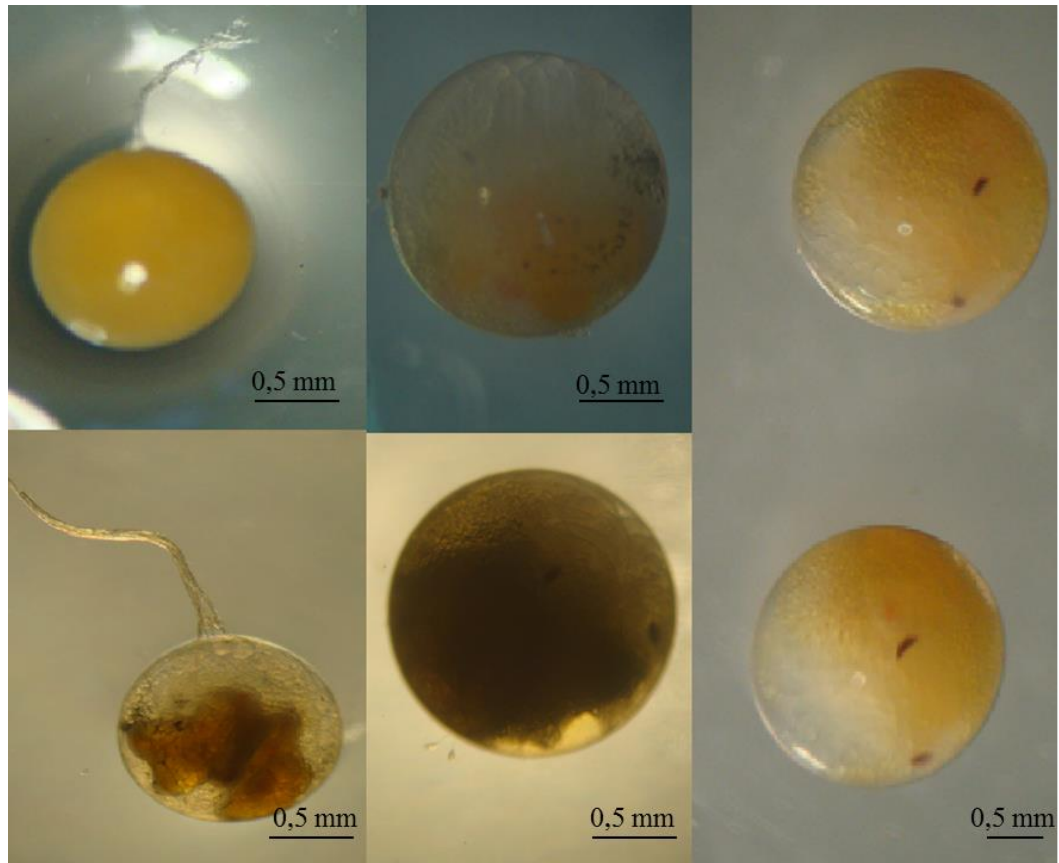


Figura 2.6. Huevos de *T. borellianus* (primera columna de la izquierda) en los que se observa el pedúnculo que lo aferra a los pleópodos del abdomen materno (flecha). Huevos de *D. pagei* y *Z. collastinensis* (segunda y tercera columna, respectivamente) desnudos, sin ninguna superficie de adherencia a las setas maternas.

Durante el período de incubación se observó el cuidado materno en forma de ventilación y limpieza de la masa de huevos. Se identificaron tres tipos de movimientos de los pleópodos abdominales, a saber: movimiento “lateral”, “sube-baja” y “oblicuo” (Tabla 2.5).



Tabla 2.5. Movimientos de ventilación realizados por hembras ovígeras durante la incubación de los huevos.

Movimiento	Descripción
Lateral	Los pleópodos son movidos de un lado a otro en un mismo plano horizontal, atravesando la masa de huevos.
Sube-baja	Los pleópodos son movidos de arriba hacia abajo en un mismo plano vertical, haciendo subir y bajar la masa de huevos.
Oblicuo	Los pleópodos son movidos en un plano oblicuo a su posición inicial de modo que hacen un movimiento “envolvente” de la masa de huevos.

En *D. pagei* y *Z. collastinensis* se observó eclosión asincrónica, durando tres a cinco días entre la eclosión de las primeras y últimas crías (Tabla 2.4). En *T. borellianus*, esto no fue posible de determinar.

Los pequeños cangrejos se mantuvieron en el abdomen materno durante un período de 34 ± 4 días en *D. pagei*, 30 ± 3 días en *Z. collastinensis* y 10 ± 2 días en *T. borellianus* (Tabla 2.4).

Los juveniles recién eclosionados presentaron una reserva de vitelo observada a trasluz en el cefalotórax de las tres especies (Fig. 2.7). Esta reserva se consumió durante la primera semana después de la eclosión en *D. pagei* y *Z. collastinensis* y en un día en *T. borellianus*.





Figura 2.7. Cangrejos recién eclosionados de *T. borellianus*, *D. pagei* y *Z. collastinensis* (primera, segunda y tercera columna, respectivamente). La flecha indica la reserva de vitelo.

Durante las dos primeras semanas luego de la eclosión, las crías de *D. pagei* y *Z. collastinensis* limitaron su movimiento a la superficie abdominal interna de la hembra. Luego de este tiempo comenzaron a desplazarse ventralmente sobre la línea media, fuera del abdomen (Fig. 2.8A). Este primer movimiento de las crías en el cuerpo materno en *T. borellianus* fue observado luego de la primera semana de eclosión. Seguidamente a este período, se observaron crías en otras partes del cuerpo de la madre, como en el cefalotórax, superficie exterior del abdomen, o en la coxa de los pereiópodos (Fig. 2.8 B-F).

No se observó oofagia ni canibalismo por parte de la madre hacia las crías en ninguna de las tres especies estudiadas.



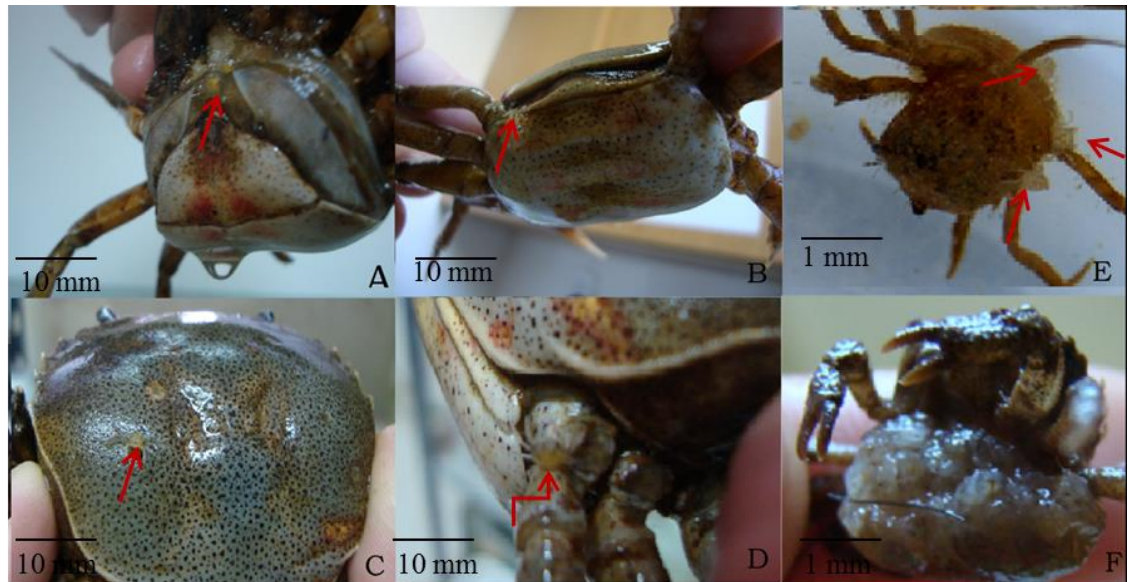


Figura 2.8. Ubicación de las crías durante el cuidado maternal post-eclosión. A-D: *Z. collastinensis*. E-F: *T. borellianus*.

Las figuras 2.9 y 2.10 resumen el ciclo comportamental de hembras de *Z. collastinensis* y *D. pagei* respectivamente.



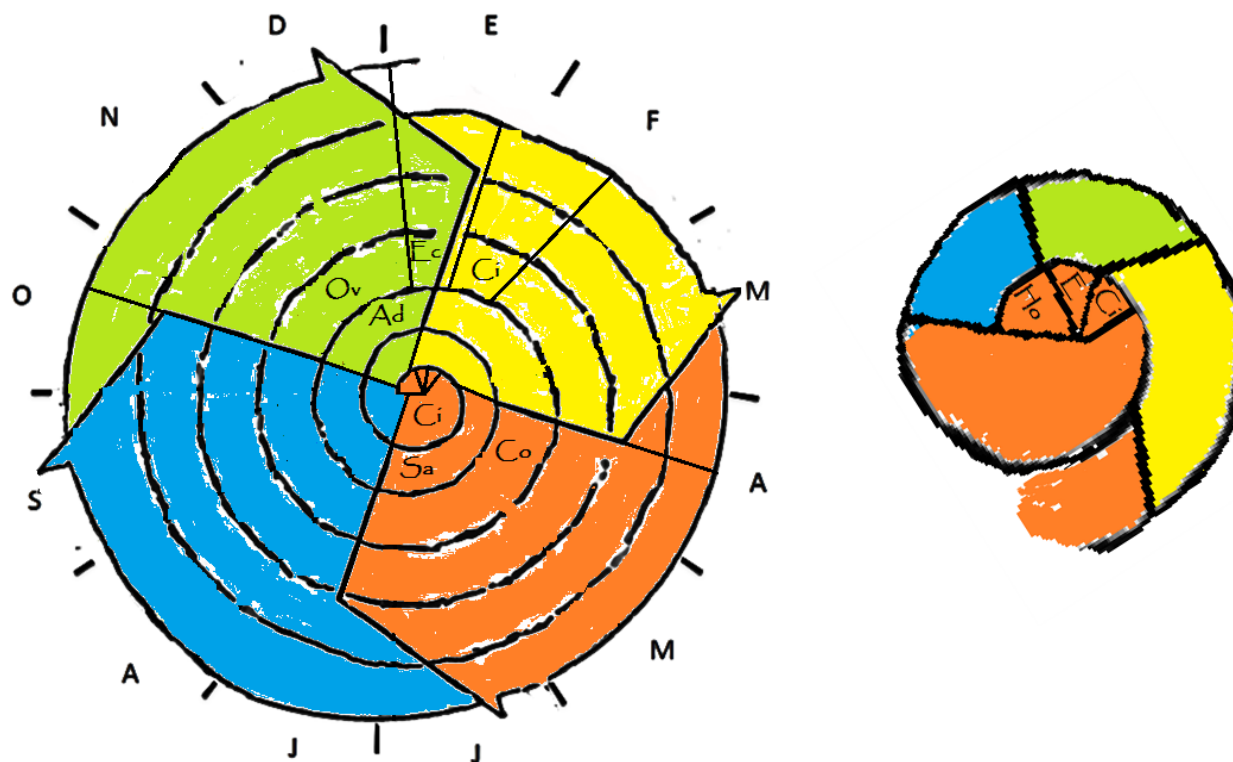


Figura 2.9. Ciclo comportamental de hembras de *Zilchiopsis collastinensis*. Ho = Huevo. E = eclosión. Ci = crías independientes. Sa = sub-adulto. Ad = adulto maduro sexualmente. Co = comportamientos agonísticos, cortejo y cópula. Ov = presencia de hembras ovígeras y cuidados maternos. Ec = eclosión de los juveniles y cuidado parentales prolongados. Las letras mayúsculas externas corresponden a los meses del año y los colores a las estaciones: amarillo = verano, naranja = otoño, azul = invierno y verde = primavera.



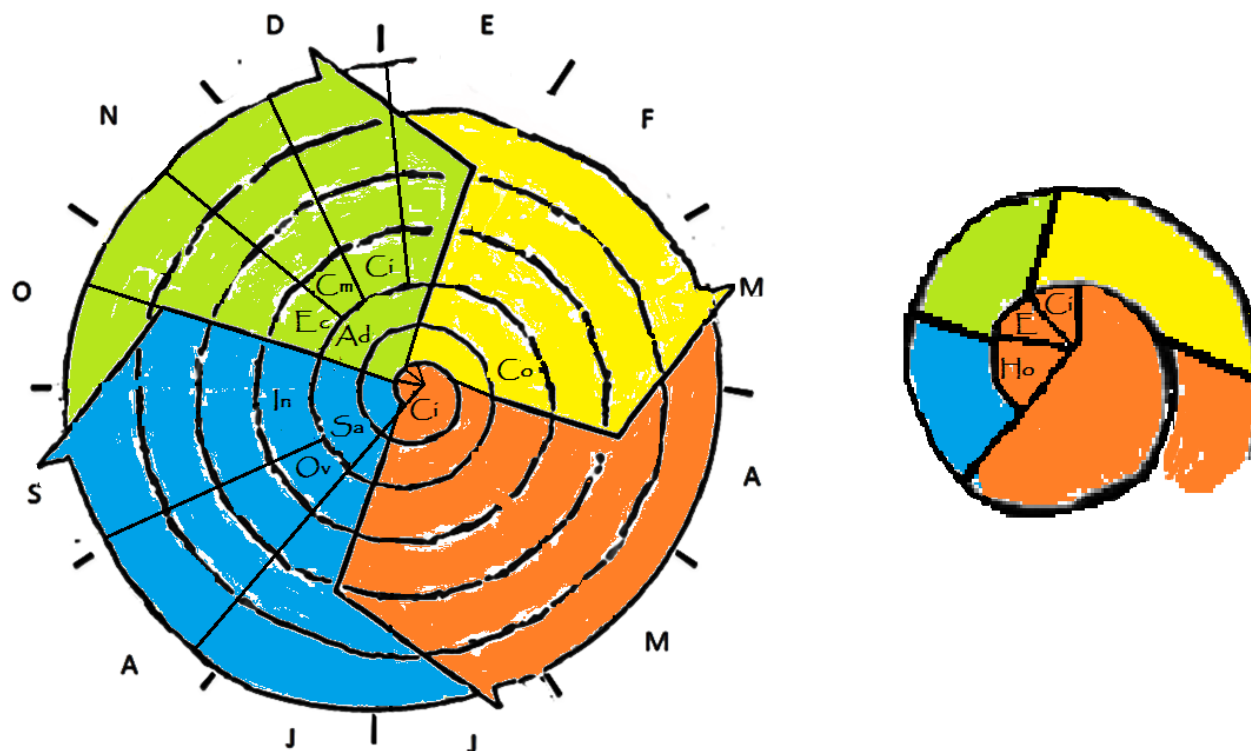


Figura 2.10. Ciclo comportamental de hembras de *Dilocarcinus pagei*. Ho = Huevo. E eclosión. Ci= crías independientes. Sa = sub-adulto. Ad = adulto maduro sexualmente. Co = comportamientos agonísticos, cortejo y cópula. Ov = presencia de hembras ovígeras. In = incubación y cuidados maternos. Ec = eclosión de los juveniles. Cm = cuidado maternos prolongados. Las letras mayúsculas externas corresponden a los meses del año y los colores a las estaciones: amarillo = verano, naranja = otoño, azul = invierno y verde = primavera.



Discusión

Comportamiento agonístico

La zona ribereña presenta un sitio ideal para el establecimiento de las cuevas que utilizan como refugio *Z. collastinensis* y *D. pagei*. En ellas el comportamiento agonístico y la posibilidad de reproducción es más frecuente (observaciones personales) (Fig. 1.2. Pag. 10, Cap. Materiales y métodos).

El comportamiento agonístico ocurre con una serie de pasos (pre-pelea, pelea, post-pelea), fases que contribuyen a una compleja interacción y dan lugar a mecanismos de reconocimiento intraespecíficos que permite la reproducción y supervivencia de la especie.

La pre-pelea permite la identificación del otro, lo que es fundamental para la evaluación del oponente (Prenter *et al.*, 2006). La evaluación de la situación que se presenta incluye tanto la estimación de las capacidades del cangrejo oponente, como las propias capacidades y riesgos u oportunidades de ganar el encuentro. Los encuentros entre rivales de similar tamaño tienen una pre-pelea corta, sin necesidad de una amplia evaluación de su oponente. Cuando hubo diferencia de tamaño, los cangrejos pequeños pasaron un largo tiempo “evaluando” sus propias capacidades frente a un oponente de mayor tamaño (Prenter *et al.*, 2006). Por lo tanto, el combate se producirá de acuerdo con la evaluación que el cangrejo realice de las propias capacidades y de las de su oponente. Las condiciones ambientales, tales como la turbidez, presencia de refugio, tipo de sedimento y la posibilidad de la construcción de cueva, afectan el reconocimiento de la capacidad del oponente. Por lo tanto, el comportamiento individual se basa en señales complejas que se transmiten dentro de las condiciones ambientales y/o la presencia de otros cangrejos. Esta señal que indica la presencia de alimentos, parejas potenciales, competidores, o kairomonas podría ser



una sustancia química producida por enemigos y depredadores (Fletcher & Hardege, 2009). Por otra parte, estas señales son elementos importantes que desempeñan un papel en el reconocimiento de las condiciones de dominancia de la población, como se observa en el cangrejo de río *Procambarus clarkii* (Zulandt-Schneider *et al.*, 1999).

El primer reconocimiento podría ser una señal pobre debido a la alta turbidez en el entorno en el que viven *Z. collastinensis* y *D. pagei*. Un segundo reconocimiento podría ocurrir durante la evaluación del oponente, donde la danza determinaría las interacciones con el oponente. El tamaño del caparazón y quelípedos, el estado nutricional y condiciones energéticas son algunos de los elementos que influyen en la pelea y el tiempo de ocurrencia de cada encuentro (Prenter *et al.*, 2006). Las diferencias de tamaño hacen que los pequeños cangrejos gasten más energía y tomen un mayor riesgo frente a una pelea, dado que deben evaluar más la situación agonística que se le presenta (Huntingford *et al.*, 1995). Tanto en *Z. collastinensis* como en *D. pagei*, los pequeños cangrejos necesitan más tiempo para evaluar el riesgo de combate.

Durante la pelea los cangrejos atrapan al oponente por los quelípedos y utilizan los pereiópodos para derribar al otro cangrejo. Luego, el ganador demostró dominio al envolver al adversario con sus pereiópodos y quelípedos, comprimiendo el oponente, prohibiéndole el movimiento. Este abrazo se observó solo en cangrejos grandes respecto al adversario, y en *Z. collastinensis*. Ante diferencias de tamaño, los cangrejos más pequeños no podían comprimir al oponente más grande. Los cangrejos de tamaño similar luchan por menos tiempo y evitando un gran gasto energético. La jerarquía social de los cangrejos se produce rápidamente después de un breve periodo de lucha (Bovbjerg, 1953).



Cortejo y cópula

Durante el cortejo de los cangrejos tricodactílicos estudiados se observó a los machos acercarse a la hembra vigorosamente. Este comportamiento podría implicar el reconocimiento sexual como en el caso de *Procambarus clarkii*, *Homarus americanus* y *Callinectes sapidus*, donde este momento antes de la cópula es utilizado por el macho para distinguir el estado de madurez de las hembras (Ameyaw-Akumfi, 1981; Glesson, 1990; Waddy & Aiken, 1991).

El comportamiento de acercamiento agresivo observado durante los ensayos con cangrejos tricodactílicos, permitiría incluirlos en el tipo de apareamiento “búsqueda e intercepción” descrito por Christy (1987). En este tipo de apareamiento, el macho intercepta a la hembra y la toma por la fuerza sin antes determinar el estado de receptibilidad de ésta. Sin embargo, en este modelo no hay competencia entre machos por las hembras. En los tricodactílicos estudiados se observó comportamiento agonístico entre machos, por lo cual podrían incluirse también en el tipo de apareamiento “dominancia de machos” caracterizado por una importante competencia entre machos para acceder a las hembras (Chrysti, 1987).

En muchas especies de cangrejos como en *Geothelphusa dehaani*, *Potamon fluviatile* y *Candiopotamon rathbunae* se observa un cortejo sutil, donde simplemente el macho toma a la hembra con fuerza y la acomoda hasta conseguir la posición apropiada para la cópula (Minei, 1976; Warner, 1977; Micheli *et al.*, 1990; Liu & Li, 2000).

El hecho de controlar a la hembra con los quelípedos antes de la cópula es una característica compartida con otros crustáceos, en particular portúnidos (Ryan, 1966; Fielder & Eales, 1972; Berrill & Arsenault, 1982; Campbell, 1982). También se ha observado en otros cangrejos marinos (Edwards, 1964; Bigford, 1979; Elner *et al.*, 1987; Donaldson & Adams, 1989; Pérez & Bellwood, 1989; Claxton *et al.*, 1994), camarones (Seibt & Wickler, 1979; Nakashima, 1995), langostas (Lipcius *et al.*, 1983; Atema, 1986; Waddy & Aiken, 1991) y langostas



de agua dulce (Mason, 1970; Ingle & Thomas, 1974; Stein, 1976; Snedden, 1990).

Durante el cortejo de *D. pagei*, se observó a la hembra realizar una serie de movimientos erráticos con los pereiópodos, no observados en cópulas fallidas. Estos movimientos podrían estar relacionados con la movilización de la estructura del poro genital posibilitando la recepción del macho y representando un estado de madurez en las hembras. De forma similar, durante el cortejo de *Aegla platensis*, la hembra exhibe una serie de contracciones en el cuerpo y el abdomen. Sin embargo, en estos anomuros tales movimientos estarían en relación con la movilización de los ovocitos del ovario al poro genital antes de la cópula (Almerão *et al.*, 2010).

La posición inferior adoptada por las hembra en las tres especies durante el apareamiento se ha observado en otros cangrejos tales como *Potamon fluviatile* (Micheli *et al.*, 1990) y *Candiopotamon rathbunae* (Liu & Li, 2000), *Austropotamobius pallipes* (Ingle & Thomas, 1974) y *Callinectes sapidus* (Gleeson 1991; Jivoff *et al.*, 2007). La posición superior del macho podría estar relacionada con la transferencia de esperma a los receptáculos seminales de la hembra, facilitando su traspaso por la acción de la gravedad. Como también para mantener la posición correcta y completar la cópula, dado que la capacidad de mantener el control físico de las hembras es fundamental para el éxito de apareamiento (Jivoff *et al.*, 2007).

El corto tiempo de duración de las cópulas, medido en minutos, en *D. pagei* y *T. borellianus*, contrasta con las horas utilizadas por *Z. collastinensis*. Sin embargo, lo habitual es que los tiempos de cópula sean medibles en minutos (Hartnoll, 1989), sobre todo cuando se trata de cópulas en duro donde no hay presencia de abrazo o cuidado post-cópula (Sastry, 1983; López-Greco, 1997) como se observó en *Z. collastinensis*. Es común que este tiempo varíe entre las especies de decápodos, oscilando entre 12 minutos y 21 días, como por ejemplo en



C. sapidus (Gleeson, 1991), *Austropotamobius pallipes* (Ingle & Thomas, 1974), *P. fluviatile* (Micheli *et al.*, 1990) y *Orconectes limosus* (Bechler, 1981). El rango de tiempo utilizado en las diferentes especies tiene relación con la condición de la hembra respecto a su ciclo de muda al momento de la cópula (Hartnoll, 1969).

Desove y cuidado maternal

También se observó que las tres especies poseen diferentes estrategias reproductivas, teniendo una desigualdad temporal respecto a los meses utilizados en la cópula, incubación y cuidados maternos.

En *T. borellianus* la estrategia reproductiva es tener varias puestas a lo largo del año, a diferencia de *D. pagei* y *Z. collastinensis*, que solo tienen una.

El desove observado fuera del agua en el cangrejo de agua dulce *C. rathbunae* (Liu & Li, 2000), podría relacionarse con lo observado en los cangrejos tricodactílicos estudiados. Y aunque no se verificó directamente la bajada de huevos (propia mente dicha), sí se observó el momento inmediatamente posterior, con lo cual podría especularse que el desove sea también fuera del agua. Este inhabitual comportamiento podría estar relacionado con la prevención del daño que podrían ocasionar los movimientos del agua durante la temporada de extrusión de los huevos (Liu & Li, 2000). También estaría en juego la finalización de la fecundación de los huevos, que duraría entre 60 a 90 minutos después de ser extruidos (McLay & López Greco, 2011) y además esta estrategia conductual colaboraría en el endurecimiento rápido de la pared del corion en los huevos recién extruidos. Dado el medio hiperosmótico, esto ayudaría a aislar al huevo, evitando un excesivo ingreso de agua, tal como se observó en otros decápodos, donde el saco embrionario se modifica y hay formación de capas en la pared del corion dentro de las primeras horas después de la oviposición (Sandifer & Lynn, 1980; Lynn & Clark, 1983; Talbot & Goudeau, 1988; Goudeau *et*



al., 1991; Lynn *et al.*, 1993; Glas *et al.*, 1997).

Durante el período de incubación -en contraste con el de apareamiento- se detectó que las hembras fueron muy susceptibles a los estímulos externos. Ante un evento durante el cual tuvieron que sumergirse recientemente ovígeras, liberaron espontáneamente los huevos en cualquier momento de la incubación, siendo menor al final del período. Este hecho fue observado también por Mansur *et al.* (2002) en hembras ovígeras de *D. pagei*.

Esta situación permite hipotetizar que ante este periodo de fragilidad, las hembras tengan hábitos que les permitan resguardarse. De este modo se dificulta encontrar hembras ovígeras en el ambiente natural, particularmente en el caso de *D. pagei*, como fuera mencionado también por Taddei (1999) y Mansur *et al.* (2002).

La retención post-eclosión de reserva de vitelo en los juveniles de las especies de tricodactílicos estudiados, podría representar una fuente de alimento utilizado hasta la calcificación completa de los apéndices bucales. En los pequeños cangrejos esto permitiría luego consumir los alimentos que se les presenta y también alcanzar un mayor tamaño corporal. Esta estrategia lecitotrófica es beneficiosa en ambientes donde la disponibilidad de alimentos varía, dándole a los juveniles recién eclosionados independencia trófica (Anger, 1995), lo cual se refleja en un tiempo “extra” para su completo desarrollo.

Esta etapa “extra” de cuidado materno siendo juveniles, se denomina cuidado parental extendido. Durante este tipo de cuidado parental, los juveniles -similares a adultos completamente desarrollados- son mantenidos en la “cámara incubatriz” durante un período que excede la eclosión (Thiel, 2003).

La duración de la atención materna en general es de unos pocos días, como se observó en este estudio en *T. borellianus* y en otras especies como en *C. rathbunae* (Liu & Li, 2000), *A. uruguayana* (López-



Greco *et al.*, 2004.), *A. castro* (Swiech-Ayoub & Masunari, 2001) y *A. perobae* (Hebling & Rodrigues, 1977; Rodrigues & Hebling, 1978). Sin embargo, este período fue de casi dos meses en *D. pagei* y *Z. collastinensis*, como lo observado en *Paratelphusa hydrodromus* (Pillai & Subramoniam, 1984). Esto podría ser una respuesta frente al ambiente isosmótico que los rodea -dado que los cangrejitos al eclosionar son blandos- y una estrategia hasta su completo endurecimiento evitando una excesiva entrada de agua.



Capítulo 3 – Parámetros reproductivos y consumo de oxígeno

Introducción

La estrategia adoptada por las hembras de crustáceos decápodos durante el período reproductivo es el resultado de la interacción de factores endógenos y exógenos (Pinheiro & Fransozo, 1995). Así los organismos que conquistaron los sistemas dulciacuícolas realizaron ajustes acoplando sus ciclos biológicos a los ambientales. Algunas de las principales modificaciones fueron aquellas relativas a aspectos reproductivos. Por ejemplo, aunque el volumen de los huevos producidos por las especies de crustáceos es en parte controlado genéticamente (Raven, 1961), se observa un patrón de variación de acuerdo al grado de salinidad de los ambientes y de la independencia del medio marino (Omori, 1974; Sastry, 1983). De esta manera, una de las adaptaciones de los crustáceos decápodos que conquistaron ambientes dulciacuícolas fue la disminución en el número de huevos y el aumento en su volumen (Jones & Simons, 1983; Jalihal *et al.* 1993; Odinetz-Collart & Rabelo, 1996).

En este contexto de ambientes inestables, como los existentes en los valles aluviales de ríos de llanura de inundación, las poblaciones animales presentan sincronización con los factores ambientales que influyen sobre la densidad, proporción de sexos y reclutamiento (Ranta, 1998; Ruetz *et al.*, 2005).

Dentro de la familia Tricodactylidae, *Dilocarcinus pagei* y *Sylviocarcinus australis* llevan sus huevos debajo del abdomen, pero no adheridos a los pleópodos (Mansur & Hebling, 2002). A diferencia de éstos, *T. borellianus* lleva sus huevos pegados a los pleópodos como las especies marinas (Senkman *et al.*, en preparación). Por otro lado, la mantención de la masa de huevos libres en el abdomen, precisa espacio suficiente que permita mantenerlos sin pérdidas. Por esta razón las



hembras de cangrejos sufren una muda puberal, luego de la cual su abdomen aumenta sobre todo en ancho (Taddei, 1999), considerándose este momento de transición a la fase adulta y utilizándose por lo general como talla de madurez sexual. En gran parte de los crustáceos hay una correlación positiva entre el número de huevos y una determinada variable corporal (Sastry, 1983). El abdomen es el parámetro más utilizado que permite determinar el esfuerzo reproductivo de una especie, ya que el área bajo el abdomen limita físicamente el número de huevos producidos (Bové, 2001).


Así también algunos aspectos conductuales fueron modificados, aumentando el tiempo de cuidado parental. Los tricodactílicos presentan, como estrategia conductual que contribuye al aumento de la aptitud adaptativa de la prole, cuidado parental extendido (Clutton-Brock, 1991; Thiel, 2003; Senkman *et al.*, en preparación). El cuidado parental incluye el aseo de los huevos y la ventilación mediante el batido abdominal, pudiendo implicar un aumento de la tasa metabólica (Bauer, 1989; Taylor & Leeapiyanart, 2001; Baeza & Fernández, 2002). Este comportamiento tiene un costo energético que generalmente es evaluado a nivel de tasa de consumo de oxígeno. El análisis del consumo de oxígeno de las hembras durante el desarrollo de los huevos podría ayudar a dilucidar en qué momento de su período de incubación aumenta su tasa de consumo de oxígeno (Taylor & Leeapiyanart, 2001). Por otro lado, el número de huevos extruidos en cada evento reproductivo es definido como fecundidad (Bourdon, 1962) y en braquiuros está relacionado con el tamaño del animal o su peso corporal y con la capacidad que tenga la hembra de almacenar vitelo durante el ciclo reproductivo (Du Preez & Mclachlan, 1984; Branco & Avilar, 1992; Mansur, 2002).


Desde un punto de vista ecológico y evolutivo, la caracterización de aspectos reproductivos y poblacionales como la fecundidad y el éxito




reproductivo es una herramienta importante en la comprensión de los cambios que se producen en el ambiente (Anger, 1995).

Los objetivos de este capítulo son:

 Determinar la talla de madurez sexual funcional o efectiva de hembras de *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus*.

 Determinar la fecundidad y fertilidad de *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus*.

 Evaluar el consumo de oxígeno de cangrejos adultos de *Trichodactylus borellianus* en relación con diferentes estados reproductivos.



Materiales y métodos

Los cangrejos utilizados en este capítulo fueron recolectados durante el período 2010-2012 mencionado en la metodología general.

El número de huevos se estimó mediante la recolección de hembras ovígeras que fueron trasladadas vivas al laboratorio para contar sus huevos.

La descripción de los parámetros reproductivos fue realizada en base a 300 individuos de *Z. collastinensis*, 100 individuos de *D. pagei* y 130 cangrejos de *T. borellianus*.

Los cangrejos fueron pesados individualmente (peso total = PT) utilizando una balanza digital (®Ohaus, modelo CS 200) y se tomaron las medidas de ancho de cefalotórax y abdomen con calibre digital (0,01 mm de precisión).

Los huevos fueron sacados del abdomen de cada hembra con pincel y colocados en una cápsula de Petri con agua para su conteo y tomar sus medidas. El número de huevos fue contado por hembra de *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus*. El conteo de los huevos y crías vivas se llevó a cabo con auxilio de lupa binocular.

Cálculo de fecundidad

La fecundidad fue calculada como fecundidad realizada relativa obtenida como la relación del número de huevos por desove sobre la talla, y también se calculó la fecundidad actual relativa, como el número de crías vivas recién eclosionadas en el abdomen materno sobre la talla. Estos parámetros fueron calculados para las tres especies.

En cada caso los huevos fueron contados y se determinó la etapa de desarrollo de los embriones, realizando una adaptación de la



clasificación propuesta por Taylor & Leeapiyanart (2001) y Tuset *et al.* (2011). La clasificación utilizada abarca cinco etapas, de menor desarrollo (E0 = huevos recién extruidos) a mayor desarrollo (E4 = crías recién eclosionadas) (Tabla 3.1).

Consumo de oxígeno

Los ensayos de consumo de oxígeno fueron realizados utilizando individuos de *T. borellianus* de ambos sexos recolectados en el mes de enero de 2011. Los cangrejos fueron trasladados en recipientes plásticos al laboratorio de Bioensayos del INALI y allí se mantuvieron en peceras grupales de 100 litros con aireación constante y temperatura controlada de 26 ± 2 °C (\pm desvío estándar). En los acuarios se los alimentó *ad libitum* con músculo de pescado hasta 24 horas antes del ensayo.

Las tasas de consumo de oxígeno fueron utilizadas como medidas del gasto energético. El consumo de O₂ se determinó con un sistema de cámaras metabólicas cerradas consistente en una botella hermética de vidrio de 640 cm³ de capacidad. Todas las medidas se realizaron durante el día, cuando la actividad de los cangrejos es menor, permitiendo ser consideradas como tasas metabólicas basales (Lardies *et al.*, 2004).

El registro del consumo de oxígeno fue realizado en tres grupos con distintas características reproductivas: hembras ovígeras (N = 60) con huevos en cinco etapas de diferentes de desarrollo, hembras reproductivas no ovígeras (N = 40) y machos reproductivos (N = 30). Los cangrejos fueron colocados individualmente en cada cámara. El nivel de oxígeno fue registrado con un oxímetro digital (®HANNA model HI9143) antes de colocar los organismos y luego de cuatro horas de permanencia en la cámara (tiempo estimado en ensayos preliminares). En todos los casos se calculó el consumo de oxígeno (partes por millón) por unidad de tiempo (segundos).


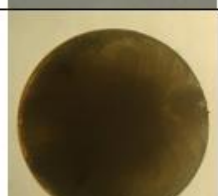


Análisis de datos

Las relaciones de regresión entre las medidas biométricas (ancho de cefalotórax, ancho de abdomen), y fecundidad y fertilidad se realizaron utilizando el paquete estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2008). La fecundidad fue comparada entre hembras con embriones en las distintas etapas de desarrollo mediante ANOVA estableciendo el ancho del caparazón como covariable. El pos-test de Tukey con un nivel de significancia del 0,05 fue utilizado para la discriminación entre las medias. La evaluación de las diferencias en la tasa de consumo de oxígeno de las hembras con embriones en distintas etapas de desarrollo, de hembras reproductivas no ovígeras y de machos reproductivos se realizó mediante ANOVA. Por último, los grupos que mostraron diferencias entre sí, fueron establecidos mediante el pos-test de Tukey de comparaciones múltiples (Zar, 1999).



Tabla 3.1. Estadios de huevos de *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus*. Adaptado de Taylor & Leelapiyanart (2011); Tuset *et al.* (2011).

Estadio	Descripción	Imagen
E0	Huevo con vitelo uniforme	
E1	Huevo con más del 50% de vitelo uniforme, se observa la zona libre de vitelo.	
E2	Huevo con menos del 50% de vitelo, esbozos de pleópodos, corazón bombeando y presencia de mancha ocular semilunar.	
E3	Huevo con presencia de ojos, abdomen y pleópodos segmentados. El embrión ocupa la mayor parte del huevo.	
E4	Cangrejos recién eclosionados.	



Resultados

Parámetros reproductivos

Zilchiopsis collastinensis

Los cangrejos recolectados tuvieron una frecuencia de 100 juveniles y 200 adultos: 100 machos y 100 hembras. Del total de hembras, 40 fueron ovígeras y comenzaron a registrarse hacia fines del mes de octubre hasta mediados de enero (Fig. 3.1), con una alta ocurrencia en diciembre, alcanzando 50 % de la población el estado ovígero durante este mes.

La hembra ovígera más pequeña registrada presentó un ancho de cefalotórax (ACF) de 36,88 mm. Esta hembra portaba 490 huevos, mientras que la de mayor talla portaba 1.277 huevos (Fig. 3.2).

Dilocarcinus pagei

Los 100 individuos recolectados tuvieron una frecuencia de 60 juveniles y 40 adultos, de éstos, 10 fueron hembras y los restantes 30 machos. Del total de hembras cinco fueron ovígeras (tres en condiciones de laboratorio) y de ellas solo dos permanecieron ovígeras hasta el final de la incubación. Los cinco eventos se registraron durante el mes de agosto (Fig. 3.1). La hembra ovígera más pequeña tuvo un ACF de 38,65 mm y portaba 660 huevos, mientras que la de mayor talla tuvo 780 huevos (Fig. 3.2).

Trichodactylus borellianus

Los 130 cangrejos recolectados fueron adultos con una frecuencia de 30 machos y 100 hembras. Del total de hembras, 60 fueron ovígeras y comenzaron a registrarse hacia fines del mes de agosto hasta mediados de marzo, con una alta ocurrencia entre noviembre y enero



(Fig. 3.1), alcanzando 50 % de la población el estado ovígero durante este mes.

La hembra ovígera más pequeña registrada presentó un ancho de cefalotórax (ACF) de 8,18 mm. Esta hembra portaba 62 huevos, mientras que la de mayor talla portaba 102 huevos (Fig. 3.2).

Desarrollo de los huevos

Los huevos de *Z. collastinensis*, *D. pagei* y *T. borellianus* tienen forma de esfera (Fig. 5 en Capítulo 2) y su tamaño varía de acuerdo a la especie entre 1 mm (*T. borellianus*) y 2 mm (*Z. collastinensis* y *D. pagei*), manteniendo su tamaño hasta el fin de su desarrollo.

Los huevos en *Z. collastinensis* y *D. pagei* no se encuentran adheridos a los pleópodos, a diferencia de *T. borellianus*, cuyos huevos son pedunculados.

En *Z. collastinensis* se encontraron hembras que portaban huevos en estadios iniciales (E0) durante los meses de octubre a diciembre, alcanzando los estadios finales hasta el mes de febrero.

En *D. pagei* solo se registraron hembras ovígeras durante el mes de agosto, y los huevos se encontraban en estadio E0, o sea recientemente extruidos; dado que no se presentaba diferenciación dentro del huevo ni divisiones, el huevo estaba completamente lleno de vitelo.

En *T. borellianus* se observó un patrón de distribución parejo de los estadios de los huevos. Durante los meses de enero, febrero, marzo, abril, septiembre y diciembre se encontraron huevos iniciales (E0), intermedios (E2) y en estadios finales (E3-E4).



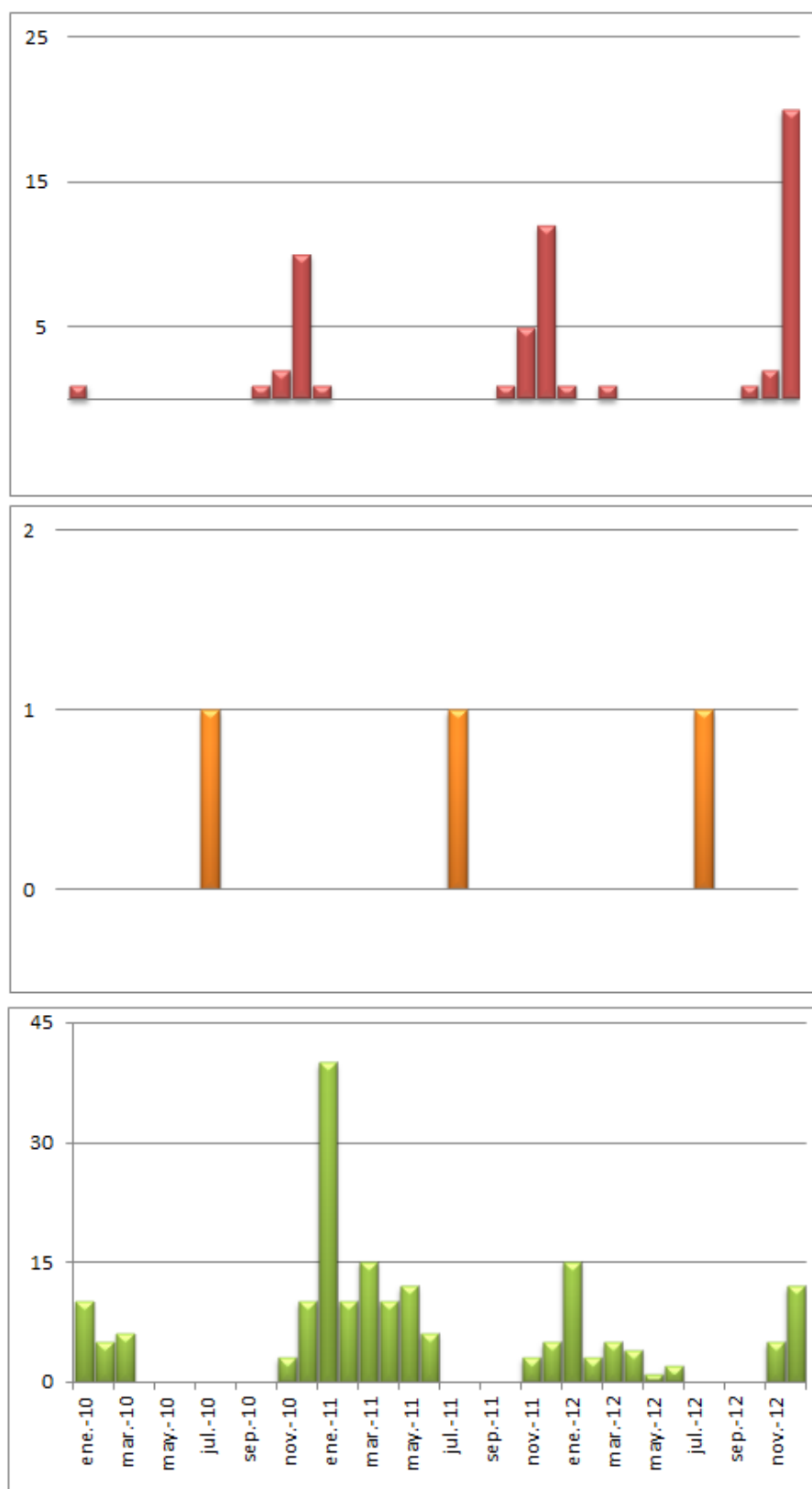


Figura 3.1. Distribución de hembras ovígeras de *Zilchiopsis collastinensis* (rojo), *Dilocarcinus pagei* (naranja) y *Trichodactylus borellianus* (verde) durante el período 2010-2012.



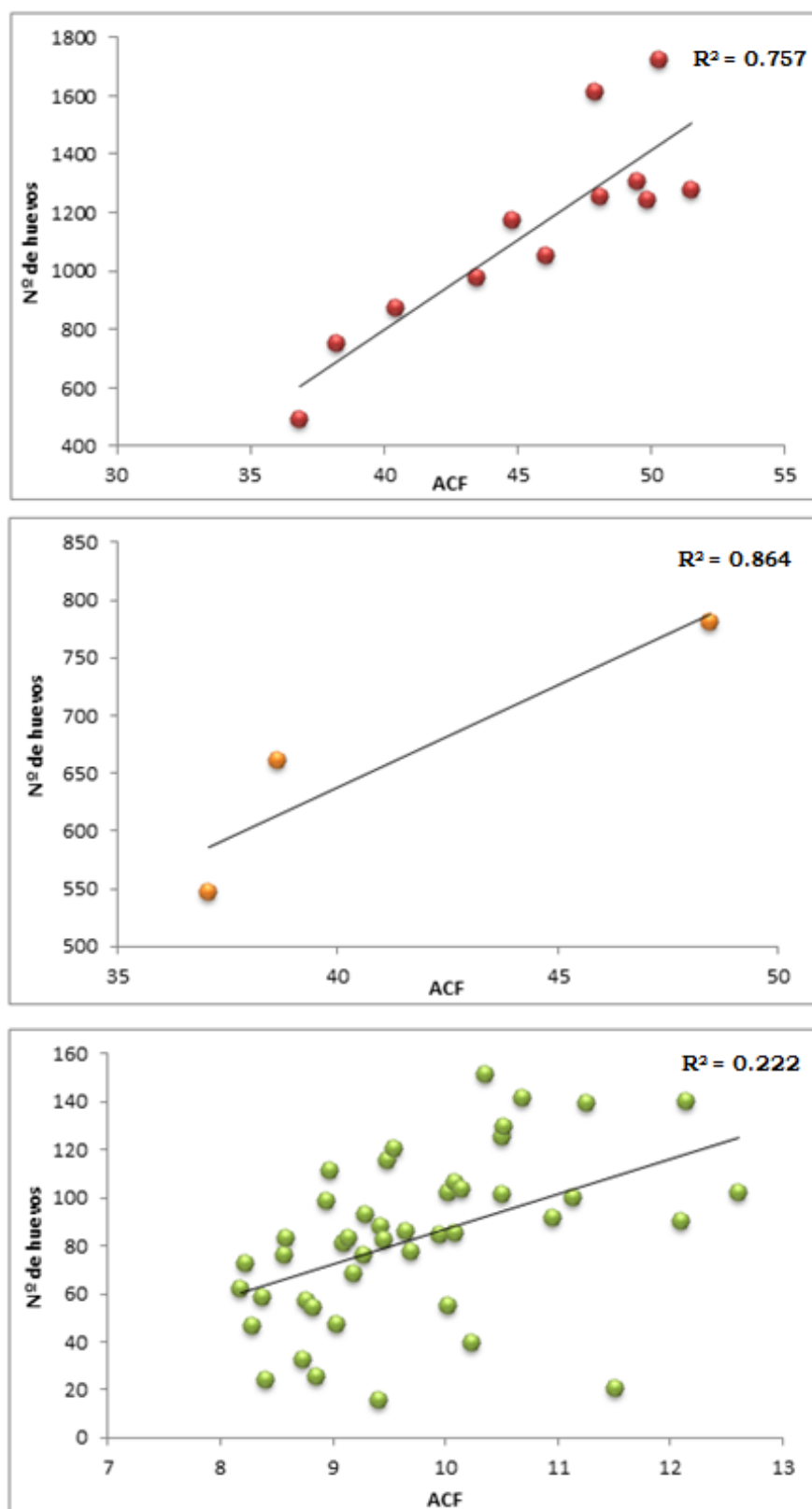


Figura 3.2. Número de huevos (sin tener en cuenta su grado de desarrollo) con relación al ancho del cefalotórax (ACF). *Zilchiopsis collastinensis* (rojo), *Dilocarcinus pagei* (naranja) y *Trichodactylus borellianus* (verde).



Fecundidad

La fecundidad realizada relativa fue 25,04 en *Z. collastinensis*, 15,99 en *D. pagei* y 10,60 en *T. borellianus*. No se encontraron diferencias significativas entre las tres especies en el número de huevos, (Kruskal- Wallis: $P=0.368$) (Fig. 3.3).

Por otra parte, el número de huevos se incrementa en forma directamente proporcional al aumento de tamaño del abdomen y del cefalotórax en las tres especies (Figs. 3.2 y 3.4).

En *T. borellianus* la relación entre número de huevos y las medidas morfométricas tuvieron un valor de correlación más alto (r^2) cuando se consideró como variable independiente el AA en lugar de ACF (Fig. 3.4). *Zilchiopsis collastinensis*, por su parte, tuvo un valor de correlación mayor y se observó un mejor ajuste de los datos relacionando el número de huevos con el ACF (Fig. 3.2).

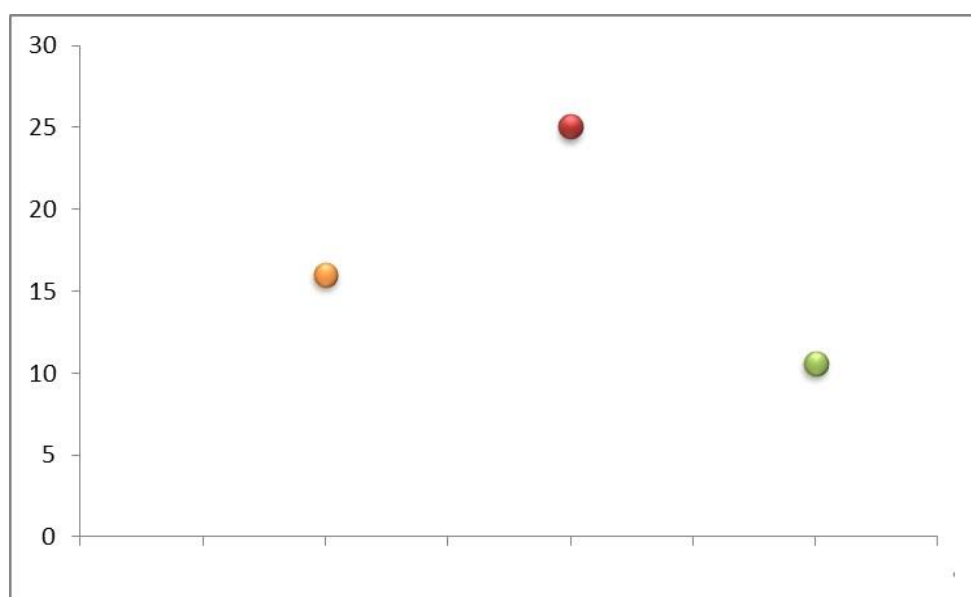


Figura 3.3. Fecundidad realizada relativa en *Dilocarcinus pagei* (naranja), *Zilchiopsis collastinensis* (rojo) y *Trichodactylus borellianus* (verde).



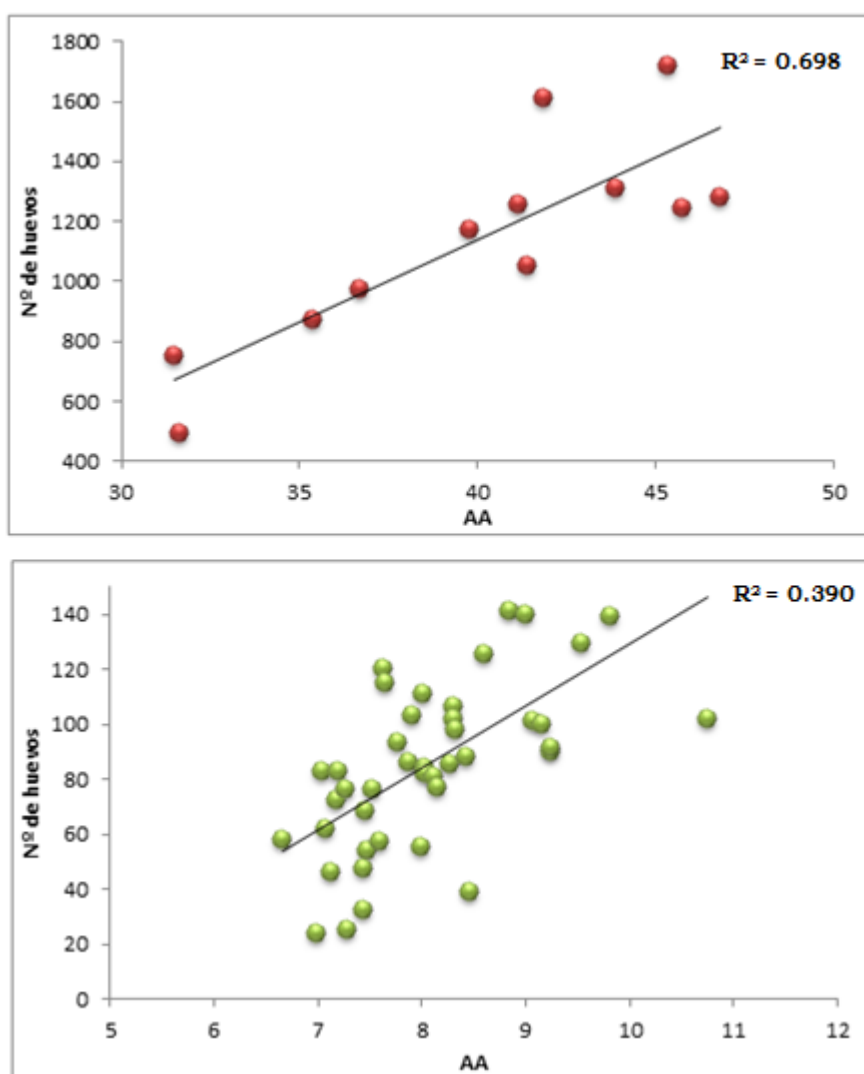


Figura 3.4. Número de huevos (sin tener en cuenta su grado de desarrollo) con relación al ancho del abdomen (AA) en *Zilchiopsis collastinensis* (rojo) y *Trichodactylus borellianus* (verde).

La fecundidad actual relativa (número de crías vivas por hembra/ACF) fue de 14,27 en *Z. collastinensis* 14,06 en *D. pagei* y 8,15 en *T. borellianus* (Fig. 3.5).

La comparación de estos valores indica que no hay diferencias significativas entre las tres especies (Kruskal- Wallis: $P=0.368$).



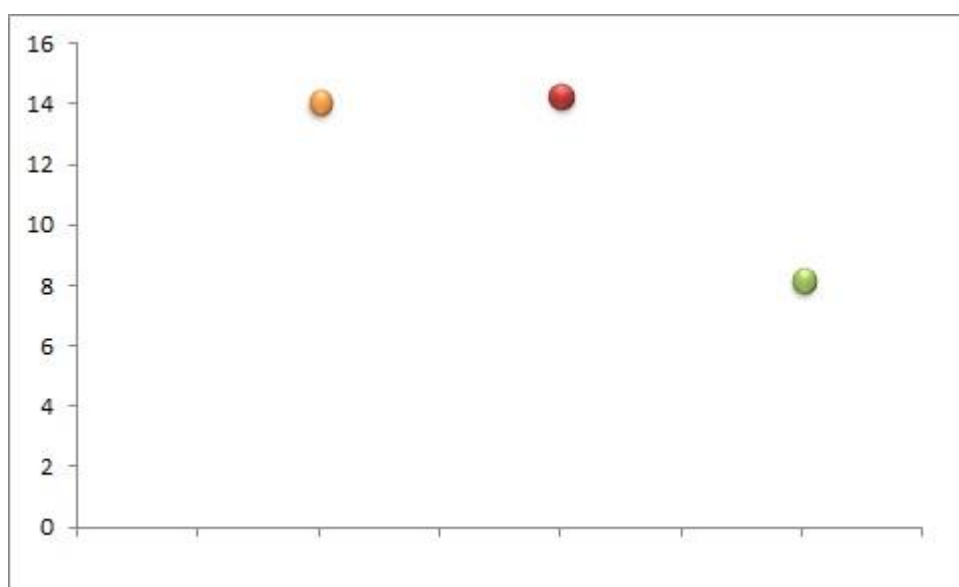


Figura 3.5. Fecundidad actual relativa en *Dilocarcinus pagei* (naranja), *Zilchiopsis collastinensis* (rojo) y *Trichodactylus borellianus* (verde). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) y las barras de error representan el desvío estándar.



Consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (ppm/gr) no mostró diferencias significativas entre machos, hembras sin huevos y hembras ovígeras (ANOVA, $F: 0,611$, $p > 0,05$) (Fig. 3.6).

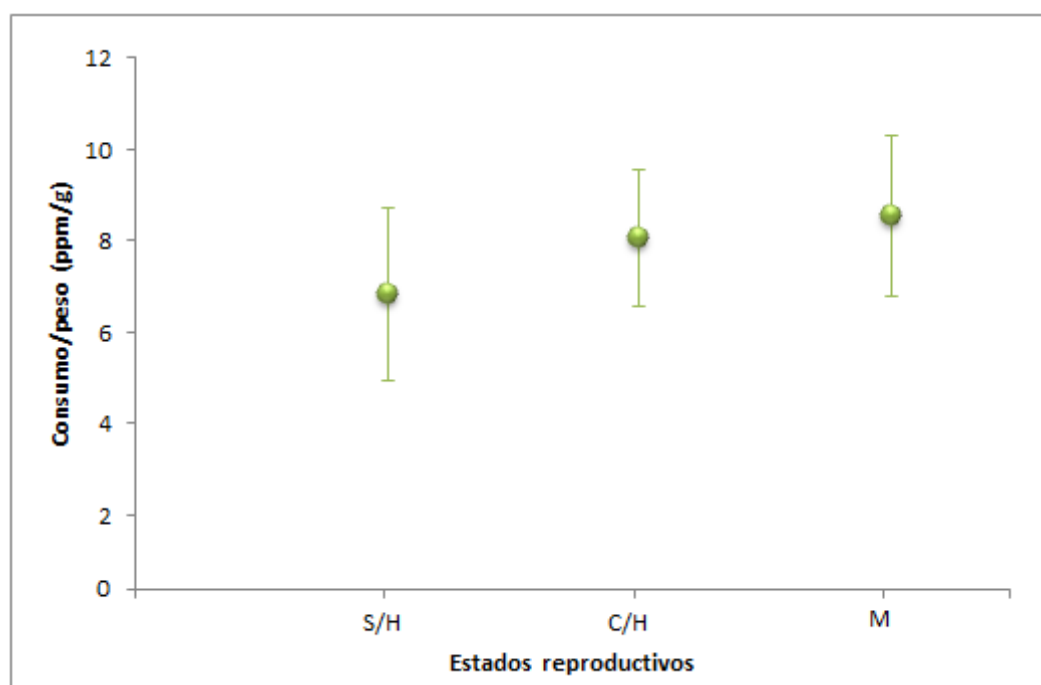


Figura 3.6. Tasa de consumo de oxígeno de *Trichodactylus borellianus* según su sexo y estado reproductivo (S/H = hembras reproductivas sin huevos; C/H = hembras reproductivas con huevos; M = machos reproductivos). Las barras de error indican el desvío estándar.

Sin embargo, las tasas de consumo (ppm/gr) de hembras ovígeras con distintos estadios de desarrollo de los huevos, mostraron diferencias significativas (ANOVA, $F: 2,59$, $p < 0,05$). El post-test de Tukey de múltiples repeticiones evidenció que la tasa de consumo de las hembras con huevos en E3 fue significativamente mayor en relación a E4 (Fig. 3.7).



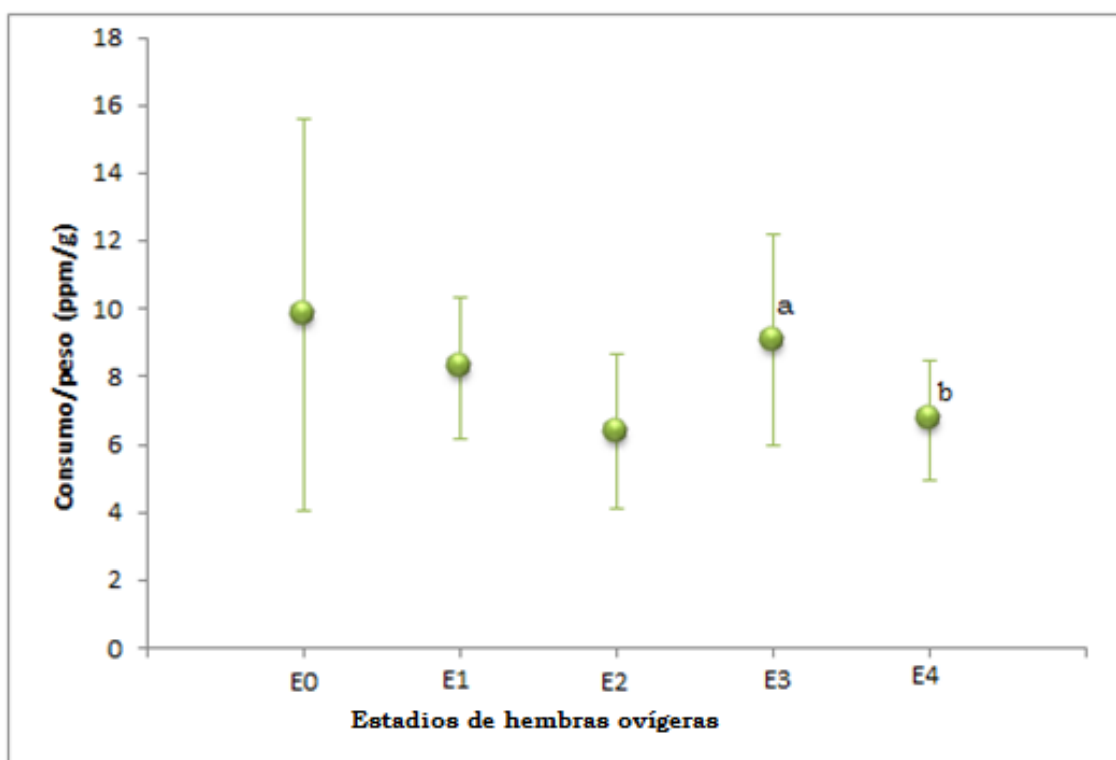


Figura 3.7. Tasa de consumo de oxígeno de hembras ovígeras de *Trichodactylus borellianus* en función del estadio de los huevos (E0 = huevo con vitelo uniforme; E1 = huevo con más de 50 % de vitelo uniforme y zona libre de vitelo; E2 = huevo con menos de 50 % de vitelo, esbozo de pleópodos, corazón bombeando y presencia de mancha ocular semilunar; E3 = huevo con presencia de ojos, abdomen y pleópodos segmentados; el embrión ocupa la mayor parte del huevo; E4 = cangrejos recién eclosionados). Las barras de error indican el desvío estándar. a y b indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en la tasa de consumo de oxígeno entre E3 y E4.



Discusión

Variables reproductivas

El número de huevos de las tres especies de tricodactílicos varió significativamente, teniendo *T. borellianus* un número bajo de huevos respecto a *D. pagei* y *Z. collastinensis*. Sin embargo, *T. borellianus* presentó al menos dos eventos reproductivos anuales y las otras dos especies uno solo. De este modo se puede considerar que *T. borellianus* profundiza la estrategia para optimizar la reproducción, eclosionando una menor cantidad de juveniles en varias puestas anuales, sin perder de vista que *T. borellianus* pertenece a las especies de pequeño porte. En otra especie de este género, *T. kensleyi*, el tamaño de la puesta varía entre 75 y 119 (Konig *et al.*, 2008).

En ambientes de Brasil, Mansur y Hebling (2002) registraron valores entre 120-299 huevos en *D. pagei* y una fertilidad de 83-1.057 crías. Las diferencias en cuanto al número de huevos y crías respecto a los especímenes de *D. pagei* encontrados en el presente estudio (662 ± 117 y 582 ± 8 , respectivamente), podrían deberse a las adaptaciones de la especie a condiciones ambientales diferentes. La temperatura es el principal factor regulador del crecimiento y fecundidad (Giese, 1959; Sastry, 1966; Jones & Simons, 1983), por lo cual toda variación en los patrones reproductivos de una especie distribuida en una zona geográfica estarán asociados a un gradiente térmico latitudinal (Clarke 1987; 1992). Por otro lado, Mansur y Hebling (2002) establecieron la talla de madurez en *D. pagei* en 32,0-34,0 mm de ACF, mientras que en nuestra región se encontró la hembra ovígera más pequeña en 38,65 mm. Es sabido que la talla de madurez sexual de los organismos aumenta progresivamente con la latitud. Esta tendencia a menudo se relaciona con la temperatura y las diferencias metabólicas que se



producen a lo largo del rango latitudinal de una especie, es decir, a bajas temperaturas los individuos crecen y maduran más lentamente que a temperaturas mayores (Annala *et al.*, 1980; Clarke *et al.*, 1991). La variación latitudinal en la ecología reproductiva de una misma especie constituye información relevante que permite conocer las adaptaciones al ambiente (Sastry, 1970).

Otra adaptación de los cangrejos tricodactílicos es que el tamaño de sus huevos es mayor comparados con especies marinas (Bliss, 1968; Liu & Li, 2000). Esta característica está relacionada con el desarrollo directo que, evolutivamente, acompañó la conquista del ambiente dulciacuícola (Mansur & Hebling, 2002). El tamaño de los huevos tiene importantes consecuencias en la tasa de desarrollo y en el tamaño de los juveniles al momento de eclosión (Negreiros-Fransozo *et al.*, 1992).

Existe un consenso que establece un patrón general donde el número de huevos aumenta junto al incremento del tamaño corporal de la hembra (Hines, 1982; Hartnoll, 1985). De acuerdo con esto se observó en los tricodactílicos estudiados una correlación positiva entre el tamaño de la hembra (ya sea ACF o AA) y el número de huevos.

Gasto energético

En *T. borellianus* se observó que el consumo de oxígeno fue similar en machos, hembras ovígeras y en hembras no ovígeras. Si bien hay una limitación morfológica y fisiológica respecto al número de puestas que pueden producir (Rabalais, 1991), se observó que *T. borellianus* tiene varias puestas al año. Por otro lado, en cangrejos marinos se observó que las hembras ovígeras consumen sustancialmente más cantidad de oxígeno que hembras no ovígeras (Fernández *et al.*, 2000; Baeza & Fernández, 2002; Brante *et al.*, 2003), lo que indicaría un costo



de suministro de oxígeno para los embriones (Fernández & Brante, 2003).

Las diferencias de consumo de oxígeno entre hembras con huevos en E3 y E4 pueden deberse a que el E3 es el último estadio de desarrollo embrionario antes de la eclosión y este último tiempo dentro del huevo requiere más energía (Taylor & Leeapiyanart, 2001), para luego disminuir y estabilizar el consumo de oxígeno. Esto también se observa ya que durante todo el período de desarrollo del huevo, se mantiene una tendencia de consumo de oxígeno que cambia al eclosionar el cangrejo juvenil.

El costo de la reproducción es tradicionalmente interpretado como una consecuencia del conflicto entre la demanda de recursos para la reproducción, el crecimiento y el metabolismo basal (Barnes & Partridge, 2003). En los crustáceos existen profundas diferencias en las estrategias reproductivas al analizar el número, el tamaño y el tiempo de incubación de huevos entre especies marinas de ambientes dulciacuícolas.

En general, el cuidado parental se ha asociado con la protección de las crías frente a los depredadores o las condiciones adversas del ambiente (Thiel, 1999). Pero además de estas conductas, la mayoría de las hembras ovígeras de decápodos presentan cuidados asociados específicamente a la provisión de oxígeno a los embriones, siendo éste un factor limitante (Fernández *et al.*, 2000; Baeza & Fernández, 2002).

El consumo de oxígeno en hembras ovígeras de *T. borellianus* muestra una tendencia a invertir energía simultáneamente en el cuidado parental de incubación de los huevos y en el desarrollo de gónadas optimizando la ocurrencia de un nuevo evento reproductivo. Por esta razón se observa un consumo más alto en hembras ovígeras que en hembras no ovígeras.




Conclusiones

A partir de lo expuesto en apartados anteriores, se arriba a las siguientes conclusiones finales:

- La estructura del sistema reproductor masculino se presenta como una estructura pareada con diferenciación estructural y en tonalidad. En *Zilchiopsis collastinensis* toma una forma de “U” invertida, ya que ambas estructuras pares se unen en su parte anterior por una comisura de tejido conectivo. En *Dilocarcinus pagei* la estructura es en forma de “II”, sin comisuras de unión. Estas formas no han sido registradas con anterioridad y podrían estar relacionadas con el anclaje de los testículos a la pared superior del cefalotórax. Dado que ésta es la zona de proliferación y el lugar inicial de maduración (en estadios inmaduros sexualmente, suele observarse solo el testículo), podría ubicarse en su extremo anterior con el fin distribuir hacia caudal las células sexuales que van madurando. Sin embargo, la estructura del sistema reproductor masculino respeta el patrón general propuesto para los decápodos. Su organización consiste en un testículo con múltiples túbulos entrelazados que forman una masa casi homogénea y compacta, difícil de discernir en su recorrido. Los túbulos seminíferos se encuentran rodeados por una fina cápsula de tejido conjuntivo que los agrupa en lóbulos y se encuentran delimitados por células accesorias aplanadas con escaso citoplasma. Dentro de cada lóbulo las células germinales (espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides) se encuentran en la misma etapa de desarrollo y de acuerdo con el grado de madurez del macho. Estos túbulos colapsan en túbulos colectores y éstos en un único vaso deferente. El vaso deferente es reconocible en machos sexualmente reproductivos por su coloración blanquecina que varía a lo largo de su recorrido. El epitelio del VDA es columnar y



multinucleado y es aquí donde los espermatozoides se agrupan formando un conglomerado de espermatozoides en forma de “racimo de uvas” que luego es encapsulado en el VDM formando los espermatóforos. El vaso deferente medio tiene epitelio columnar con núcleos basales y tejido conjuntivo rodeando el túbulo. En la luz se observan los espermatóforos formados y líquido seminal. El vaso deferente distal se divide en dos partes, una anterior que se diferencia del VDM por su pronunciada pared con evaginaciones o embolsamientos formado de células columnares secretoras. En su extremo posterior se observó una estructura de aspecto graso que se diferencia del resto del vaso deferente a simple vista, sin registro para la familia, siendo en *Z. collastinensis* color naranja traslúcido y en *D. pagei* transparente-blancuzco. Dado que histológicamente no se observó presencia de espermatozoides ni ninguna célula germinativa o sexual -pero sí abundante líquido que ocupa toda la luz del túbulo- se propone sea éste un lugar de almacenamiento de fluido seminal para la inseminación. La presencia, tanto del vaso deferente como su estructura distal, evidencia la madurez morfo-fisiológica del macho por la acumulación de esperma.

 La estructura del sistema reproductor femenino de *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* es similar, tanto a nivel macroscópico como microscópico.

Las hembras presentan un ovario único con forma de “U” invertida y ubicación dorso-central en el interior del cefalotórax. Este tipo de ovario es una novedad entre los crustáceos y no ha sido registrado nunca en otros cangrejos. Esta forma inusual del ovario podría estar relacionada al gran tamaño de los oocitos y dado que ambas especies presentan un número elevado de huevos respecto a otros cangrejos dulciacuícolas, esta forma de “U” invertida podría ocupar de forma más eficiente el espacio disponible en el cefalotórax y





destinar así mayor vitelo a los oocitos. La estructura microscópica del ovario, tanto en hembras maduras como inmaduras, se mantiene constante en su forma y ubicación. Sin embargo, diferencias tales como el tipo de células y su grado de maduración varía de acuerdo a la etapa reproductiva en que se encuentre la hembra. La estructura microscópica del ovario se presenta de acuerdo al patrón general propuesto para los decápodos, siendo similar en toda su forma. En hembras inmaduras la distribución de oocitos es homogénea encontrándose en previtelogénesis y vitelogénesis endógena, con el *germarium* centrado. En cambio, las hembras maduras de ambas especies presentan diferentes tipos de células: germinativas (oogonias, oocitos en distinto desarrollo) y somáticas (células foliculares), en tanto el *germarium* se ubica más dorsal respecto a la luz ovárica. Dado al gran tamaño de los oocitos, la centralización del *germarium* y la distribución de los oocitos de acuerdo a su madurez, podría pensarse en una estrategia para maximizar el espacio disponible en el ovario y éste en el cefalotórax.


- 🦀 Ambas especies presentan receptáculos seminales con unión oviductual dorsal que se comunican a la vagina para concluir en una vulva. Este tipo de unión al ovario tiene implicancias tanto comportamentales como morfológicas propias de la reproducción. El hecho de que la unión sea a nivel dorsal respecto al receptáculo, podría estar indicando, por un lado el tipo de cópula y, sobre todo, el destino de la paternidad de los huevos. Dado que el esperma almacenado en los receptáculos seminales es indispensable para la fecundación de los oocitos, el punto de unión receptáculo seminal - oviducto - ovario determinará la paternidad de los huevos depositados por la hembra en el orden en que fue depositado el esperma, pero de acuerdo al lugar donde se una el oviducto al receptáculo. En este caso donde la unión oviductual es dorsal,



podría pensarse que el primer macho que fecunde a la hembra tendrá al menos el mayor porcentaje de huevos fecundados con su material genético. También la cópula “corta” observada en *Dilocarcinus pagei* podría estar vinculada a este hecho y dado que el macho no tiene forma de “evaluar” si la hembra ya tuvo cópulas anteriores, invierte poco en cada cópula. La estrategia es inversa en *Zilchiopsis collastinensis*, ya que se trata de una cópula larga, de varias horas donde “retiene” más tiempo a la hembra e invierte mayor cantidad de esperma en cada evento.


 Las diferencias en la talla de madurez morfológica es marcada en *Dilocarcinus pagei*, donde también hay presencia de heteroquelia. Esta situación puede deberse a que los machos deben competir por las hembras y, dada esta situación, maduran a una talla menor para tener más opciones de transferencia de su material genético. En el caso de las hembras, al contar con estructuras especializadas en la retención del esperma, podrían invertir en crecimiento con el fin de cargar un número de huevos mayor y así optimizar la reproducción.

 En *Zilchiopsis collastinensis* las tallas parecen estar sincronizadas y dado que se los encuentra formando cangrejales, esto podría indicar que la competencia por las hembras no es tan marcada como en el caso de *D. pagei*. Por otro lado, la talla mínima de madurez morfológica indicaría una estructura poblacional marcada por la dominancia donde las tallas mayores relegan a las más pequeñas a momentos diferentes de cópula y desove.

 Los valores del índice hepatopancreático (IHP) encontrados en *Zilchiopsis collastinensis* no fueron significativamente bajos; sin embargo, se observó una coordinación entre sus valores y los del índice gonadosomático (IG). Esta relación inversa muestra que aun





cuando hay una disminución del IHP al aumentar el IG, ésta no es significativa, por lo cual podría esperarse que la energía requerida durante el crecimiento ovárico provenga de otros sitios de síntesis como los cuerpos grasos o propiamente del ovario, según se observa en otros crustáceos.

 Los comportamientos agonísticos observados en *Zilchiopsis collastinensis* y *Dilocarcinus pagei* fueron similares, observándose antes, durante y después de las cópulas y entre machos. El comportamiento agonístico observado durante el cortejo y cópula presentó un patrón general en las tres especies, siendo unidireccional -de los machos a las hembras- con el fin de mantener el control del evento reproductivo.

Los movimientos involucrados en el comportamiento agonístico se caracterizan por un tiempo de reconocimiento, al que sigue un acercamiento donde los participantes “miden sus fuerzas” y se dan toques con los pereiópodos y quelípedos, midiendo literalmente el alto del cefalotórax del oponente. Luego de este tiempo de mutuo reconocimiento se observaron dos situaciones, la sumisión y dominancia o un nivel de agresión mayor comenzando un combate. *Zilchiopsis collastinensis* presentó un movimiento propio, que se denominó “abrazo”, en el cual el cangrejo dominante abraza al oponente subiéndose sobre él y envolviéndolo con sus pereiópodos. Este comportamiento provoca un estrés irreversible y muerte posterior y se observó en cangrejos donde la diferencia de talla permitiría al dominante envolver con sus extremidades al sometido. El comportamiento agonístico observado en los cangrejos tricodactílicos es similar al de otros cangrejos; sin embargo, el abrazo de *Z. collastinensis* no fue registrado antes y dado que estos cangrejos conviven en cangrejales durante al menos algún momento de su ciclo, es de esperar que compitan por los recursos y deban establecer patrones de dominancia para el acceso a los mismos.



 El cortejo en *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* es corto y agresivo. Consiste en una serie de movimientos donde el macho identifica a la hembra, se acerca y la toma de uno o varios pereiópodos. Las hembras de *D. pagei* presentaron movimientos erráticos en los pereiópodos desde producido el encuentro hasta el comienzo de la cópula, los que podrían estar relacionados con la receptibilidad de la hembra en relación con la apertura de los gonóporos. Dado que en encuentros donde las cópulas no se produjeron estos movimientos no se realizaron, se propone seguir con ensayos para esclarecer este punto.

 Las cópulas observadas tanto en el laboratorio como en el ambiente natural tuvieron lugar con el cefalotórax “en duro”. En las tres especies se observó un patrón de conducta agresivo durante la cópula, en el que el macho tiene el control del evento reproductivo y la hembra se limita a la participación pasiva, teniendo una ubicación inferior respecto al macho. Después del apareamiento, el macho libera la hembra y se separan sin interacción posterior.

El patrón de comportamiento de las cópulas observado es similar al de otros cangrejos dulciacuícolas. Sin embargo, la distribución temporal de las mismas entre las especies estudiadas varió, siendo estacional en *Z. collastinensis* y *D. pagei* y registradas durante todo el año en *T. borellianus*. Estas diferencias entre especies de la misma familia que habitan un mismo ambiente pueden deberse a la diferente utilización del medio por cada especie. Esta podría ser una estrategia de “uso diferencial” de los recursos, donde no se superpondrían al menos en el ciclo de reproducción, extrusión de los huevos y eclosión de juveniles.



Los cuidados maternos en *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* fueron observados en función de huevos y crías, variando su tiempo en relación con la especie y siendo proporcional el tiempo de incubación y cuidado parental extendido.

Se observó un comportamiento en relación al cuidado materno, donde las hembras de las tres especies, inmediatamente luego de que depositan sus huevos en el abdomen, se ubican en algún sitio - que depende de la especie y de sus hábitos- donde el agua no cubra el abdomen.


Durante la incubación *Zilchiopsis collastinensis* por lo general se mantiene en su cueva, mientras que *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* se observaron siempre sobre plantas acuáticas. Este comportamiento poco usual de permanecer fuera del agua, estaría relacionado con evitar la pérdida de la masa de huevos por la presión de lavado que el agua ejerce sobre la misma, como también para liberarse de parásitos que no resisten la desecación. Además, la estrategia materna tiene implicancias morfológicas, ya que su abdomen cuenta con pleópodos modificados que forman una especie de “cámara incubadora” donde los huevos permanecen durante la incubación húmedos aun fuera del agua.


Durante este período se observaron cuidados maternos en forma de ventilación y limpieza de la masa de huevos.


Se identificaron tres tipos de movimientos de los pleópodos: movimiento lateral, sube-baja y oblicuo, todos con el fin de movilizar la masa de huevos y la consecuente entrada de agua oxigenada a la cámara incubadora. Estos movimientos de ventilación son comunes entre los decápodos; sin embargo, y dado que tanto *Z. collastinensis* como *D. pagei* mantienen sus huevos sueltos dentro de la cámara incubadora, esta acción conlleva otro tipo de coordinación para evitar la pérdida de la masa ovígera. El mecanismo de cohesión que



se observó entre los huevos y que permite a la masa ovígera permanecer en el abdomen materno no pudo ser descrito, por lo cual se espera en futuras investigaciones despejar dichas incógnitas.

 El evento reproductivo es una compleja relación de factores internos propios de los individuos y externos del ambiente, así como de las relaciones que se establecen entre los individuos. Se observó que cangrejos que morfológicamente se encuentran maduros no participan en el evento reproductivo de la población, o lo hacen en momentos diferentes. Por esto se obtuvo la talla de madurez sexual funcional o efectiva de hembras de *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus* a través de la talla mínima de hembras ovígeras. En general se observó una talla similar a la talla de madurez morfológica en *Z. collastinensis* y en *D. pagei*. Por lo cual podría haber una dominancia en la reproducción que permita a las hembras de menor o mayor talla entrar a tal evento en momentos diferentes.

 La fecundidad realizada relativa y actual relativa observada en *Zilchiopsis collastinensis*, *Dilocarcinus pagei* y *Trichodactylus borellianus*, muestra que si bien *T. borellianus* presenta varios eventos anuales con un número de huevos menor y las otras dos especies concentran su energía en un solo evento, haciendo una relación respecto a la talla son similares en cuanto a este aspecto reproductivo.

 Las tasas de consumo (ppm/gr) de hembras ovígeras de *Trichodactylus borellianus* con distintos estadios de desarrollo de los huevos, mostraron diferencias en huevos en estadios finales. El desarrollo embrionario conlleva un consumo de energía diferenciado



según el “momento” en que se encuentra el embrión dentro del huevo, y dado que en *T. borellianus* se observó un incremento en el último estadio de desarrollo embrionario antes de la eclosión, podría deberse a que este último tiempo dentro del huevo requiere más energía.



BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abdu, U., A. Barki, I. Karplus, S. Barel, P. Takac, G. Yehezkel, H. Laufer & A. Sagi. 2001. Physiological effects of methyl farnesoate and pyriproxyfen on wintering female crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 202: 163-175.

Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. *Biological Reviews* 45: 121-165.

Adiyodi, R. G. 1985. Reproduction and its control, pp. 147-217. En: Bliss, D. E. & H. L. Mantel (eds.) *The Biology of Crustacea Vol. 9*. Academic Press, Orlando, Florida.

Adiyodi, R. G. 1988. Reproduction and development, pp. 139-185. En: Burggren, W. W. & B. R. McMahon (eds.) *Biology of Land Crabs*. Cambridge, New York.

Adiyodi, R. G. & T. Subramoniam. 1983. Arthropoda - Crustacea, pp. 443-495. En: Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi (eds.) *Reproductive biology of invertebrates: Oogenesis, oviposition, and oosorption*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Alarcón, D. T., M. H. A. Leme, & V. J. Cobo. 2002. Population structure of the freshwater crab *Trichodactylus fluviatilis* Latreille, 1828 (Decapoda, Trichodactylidae) in Ubatuba, Northern Coast of São Paulo State, Brazil, pp. 179-182. En: Escobar-Briones, E. & F. Álvarez (eds.) *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New York.

Almerão, M., G. Bond-Buckup & M. de S. Mendonça Jr. 2010.



Mating behavior of *Aegla platensis* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) under laboratory conditions. *Journal of Ethology* 28 (1): 87-94.

Ameyaw-Akumfi, C. 1981. Courtship in the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana* 40: 57-64.

Ando, H. & T. Makioka. 1998. Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crab *Potamon dehaani*. *Journal of Morphology* 239: 107-114.

Andrews, E. A. 1916. The young of the crayfishes *Astacus* and *Cambarus*. *Smithsonian Contributions to Knowledge* 35: 7-79.

Anilkumar, G., K. Sudha & T. Subramoniam. 1999. Spermatophore transfer and sperm structure in the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology* 19: 361-370.

Annala, J. H., J. L. Mckoy, J. D. Booth & R. B. Pike. 1980. Size at the onset of sexual maturity in female *Jasus edwardsii* (Decapoda: Palinuridae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research* 14: 217-228.

Atema, J. 1986. Review of sexual selection and chemical communication in the lobster, *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 2283-2390.

Baeza, J. A. & M. Fernández. 2002. Active brood care in *Cancer setosus* (Crustacea: Decapoda: Cancridae): the relationship between female behaviour, embryo oxygen consumption, and the cost of brooding. *Functional Ecology* 16 (2): 241-251.

Barki A. & I. Karplus. 1999. Crowding female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under small-tank hatchery conditions: What is the limit? *Aquaculture* 181: 235-340.



Barnes, A. I. & L. Partridge. 2003. Costing reproduction. *Animal Behaviour* 66: 199-204.

Barreto, A. V., L. M. A. Batista-Leite & M. C. A. Aguiar. 2006. Maturidade sexual das fêmeas de *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) nos estuários dos rios Botafogo e Carrapicho, Itamaracá, PE, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 96 (2): 141-146.

Barreto, A. V., J. R. F. Silva, M. Katsuragawa & M. C. F. Raposo. 2008. Desenvolvimento dos ovários da lagosta *Panulirus echinatus* (Crustacea: Palinuridae) baseados nas análises macroscópica, microscópica e relação gonadossomática (RGS). *Revista Brasileira de Zoologia* 25 (4): 689-695.

Bauer, R. T. 1986. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 6: 313-325.

Bauer, R. T. 1989. Functional morphology, adaptive value, and phylogenetic significance of grooming in Decapod Crustacea, pp. 49-73. En: B. Felgenhauer & L. Watling (eds.). *Functional Morphology of Grooming and Feeding Appendages*. Crustacean Issues. Balkema Press.

Beatty, S. J., D. L. Morgan & H. S. Gill. 2005. Life history and reproductive biology of the gilgie, *Cherax quinquecarinatus*, a freshwater crayfish endemic to southwestern Australia. *Journal of Crustacean Biology* 25 (2): 251-262.

Bechler, D. L. 1981. Copulatory and maternal-offspring behavior in the hypogean crayfish, *Orconectes inermis inermis* Cope and *Orconectes pellucidus* (Tellkamp) (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana* 40: 136-143.



Bedê, L. M., L. M. Y. Oshiro, L. M. D. Mendes & A. A. Silva. 2008. Comparação da estrutura populacional das espécies de *Uca* (Crustacea: Decapoda: Ocypodidae) no Manguezal de Itacuruçá, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 25 (4): 601-607.

Begon, M., J. L. Harper & C. Townsend. 1999. *Ecología. Individuos, Poblaciones y Comunidades*. Ediciones Omega, Barcelona. 1147 pp.

Bell, T. A. & D. V. Lightner. 1988. Female Reproductive System, pp. 27-33. En: Bell, T. A. & D. V. Lightner (eds.) *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.

Beltzer, A. H. 1983a. Alimentación de la “garcita azulada” (*Butorides striatus*) en el valle aluvial del río Paraná medio (Ciconiiformes: Ardeidae). *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 16 (2): 203-206.

Beltzer, A. H. 1983b. Alimentación del “benteveo” (*Pitangus sulphuratus*) en el valle aluvial del río Paraná medio (Passeriformes: Tyrannidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 14 (1): 47-52.

Beltzer, A. H. 1984. Ecología alimentaria de *Aramides ypecaha* (Aves: Rallidae) en el valle aluvial del río Paraná medio (Argentina). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 16 (1): 73-83.

Beltzer, A. H. & G. Paporello. 1984. Alimentación de aves en el valle aluvial del río Paraná. IV *Agelaius cyanopus cyanopus* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Icteridae). *Iheringia, Série Zoologia* 62: 55-60.

Beninger, P. G., R. W. Elner, T. P. Foyle & P. Odense. 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius)



(Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology* 8: 322-332.

Beninger, P. G., C. Lanteigne & R. W. Elner. 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure, and histochemistry of the female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology* 13: 1-16.

Bergman, D. A. & P. A. Moore. 2003. Field observations of intraspecific agonistic behavior of two crayfish species, *Orconectes rusticus* and *Orconectes virilis*, in different habitats. *Biological Bulletin* 205: 26-35.

Berrill, M. & M. Arsenault. 1982. Mating behavior of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Bulletin of Marine Science* 32: 632-638.

Bianchini, J. J. & L. H. Delupi. 1993. Mammalia. En: Ageitos de Castellanos, Z. (ed.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 44 (2) (actualización). PROFADU (CONICET), Buenos Aires. 79 pp.

Bigford, T. E. 1979. Synopsis of biological data on the rock crab, *Cancer irroratus* Say. FAO Synopsis 123 N.O.A.A. Technical Report N.M.F.S. Circular 426, Washington, D.C. 25 p.

Binford, R. 1913. The germ-cells and the process of fertilization in the crab, *Menippe mercenaria*. *Journal of Morphology* 24: 147-201.

Bliss, D. E. 1968. Transition from water to land in decapod crustaceans. *American Zoologist* 8: 355-392.

Bó, N. A. & C. A. Darrieu. 1993. Aves Ciconiiformes. En: Ageitos de Castellanos, Z. (ed.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 43 (1B). PROFADU (CONICET), Buenos Aires. 59 pp.



Bond-Buckup, G. & L. Buckup. 1994. A familia Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arquivos de Zoologia* 32: 123-149.

Bond-Buckup, G., A. A. P. Bueno & K. A. Keunecke. 1996. Primeiro estagio juvenil de *Aegla prado* Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura, Aeglidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 1049-1061.

Borgia, G. 1979. Sexual selection and the evolution of mating systems, pp. 19-80. En: Blum, M. S. & N. A. Blum (eds.) *Sexual Selection and Reproductive Competition*. Academic Press, University of Michigan, USA.

Boschi, E. E. 1981. Decapoda Natantia. En: Ringuelet, R. A. (ed.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 26. FECIC (CONICET), Buenos Aires. 61 pp.

Bourdon, R. 1962. Observations préliminaires sur la ponte des Xanthidae. *Bulletin of Society Lorraine Science* 2: 1-28.

Bovbjerg R. V. 1953. Dominance order in the crayfish *Oconectes virilis* (Hagen). *Physiological Zoology* 26: 173-178.

Branco, J. O. & M. G. Avilar. 1992. Fecundidade em *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 9 (3/4): 167-173.

Brante, A., M. Fernández, L. Eckerle, F. Mark, H. O. Pörtner & W. Arntz. 2003. Reproductive investment in the crab, *Cancer setosus*, along a latitudinal cline: egg production, egg losses and egg ventilation. *Marine Ecology Progress Series* 251: 221-232.

Bueno, A. A. P. & G. Bond-Buckup. 1996. Os estagios juvenis iniciais de *Aegla violacea* Bond-Buckup & Buckup (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *Nauplius* 4: 39-47.



Burton, T. E. 1995. The spermatid pathway and associated reproductive structures of squat lobster *Thenus orientalis* (Lund, 1793). *Invertebrate Reproduction and Development* 28 (1): 1-23.

Campbell, G. R. 1982. A comparative study of adult sexual behaviour and larval ecology of three commercially important portunid crabs from the Moreton Bay region of Queensland, Australia. PhD Dissertation, University of Queensland, Brisbane. 253 pp.

Cano, E. & M. E. Ocete. 2000. Tamaño medio y ecología reproductiva de *Procambarus clarkii* Girard (1852) (Decapoda, Cambaridae) en las marismas del bajo Guadalquivir. *Zoologica baetica* 11: 17-26.

Castiglioni, D. S. & M. L. Negreiros-Fransozo. 2006. Ciclo reproductivo do caranguejo violinista *Uca rapax* (Smith) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) habitante de um estuario degradado em Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (2): 331-339.

César, I. I., L. C. Armendáriz, R. V. Becerra & R. Liberto. 2004. Biodiversidad de Crustacea (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, Laevicaudata, Ostracoda, Amphipoda y Brachyura Trichodactylidae) de la Mesopotamia argentina, pp. 247-251. En: Aceñolaza, F. G. (ed.) *Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino*. INSUGEO, Miscelánea 12, Tucumán.

Chapman, J. W., T. Williams, A. Escribano, P. Caballero, R. D. Cave & D. Goulson. 1999. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm. *Behavioral Ecology* 10: 298-303.

Charniaux-Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoologist* 25: 197-206.



Charniaux-Cotton, H. & G. Payen. 1988. Crustacean reproduction, pp. 279–303. En: Laufer, H. & R. G. Downer (eds.) *Endocrinology of selected invertebrate types*. Alan R. Liss, New York.

Chiba, S. 2007. A review of ecological and evolutionary studies on hermaphroditic decapod crustaceans. *Plankton and Benthos Research* 2: 107-119.

Christy, J. H. 1987. Competitive mating, mate choice and mating associations of brachyuran crabs. *Bulletin of Marine Science* 4 (2): 177-191.

Chu, K. H. 1995. Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang Estuary, China. *Journal of Crustacean Biology* 15: 214-219.

Clarke, A. 1992. Reproduction in the cold: Thorson revisited. *Invertebrate Reproduction & Development* 22 (1-3): 175-184.

Claxton, W. T., C. K. Govind & R. W. Elner. 1994. Chela function, morphometric maturity, and the mating embrace in male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 1110-1118.

Clutton-Brock, T. H. 1991. *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press, Princeton. 352 pp.

Cobo, V. J. 2002. Breeding period of the spider crab *Mithraculus forceps* (A. Milne Edwards) (Crustacea: Majidae: Mithracinae) in the southeastern Brazilian coast. *Revista Brasileira de Biologia* 19: 229-234.

Collins, P. A. 2000. Mecanismos de coexistencia de poblaciones de palaemónidos dulciacuícolas (Crustacea, Decapoda, Caridea). Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 317 pp.



Collins, P. A. 2001. Relative growth of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) (Decapoda: Palaemonidae). *Nauplius* 9 (1): 53-60.

Collins, P. A., F. Giri & V. Williner. 2006. Population dynamics of *Trichodactylus borellianus* (Crustacea Decapoda Brachyura) and interactions with the aquatic vegetation of the Paraná River (South America, Argentina). *Annals of Limnology* 42 (1): 19-25.

Collins, P. A. & A. Petriella. 1999. Growth pattern of isolated prawns of *Macrobrachium borellii* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Invertebrate Reproduction and Development* 36: 1-3.

Collins, P. A., V. Williner & F. Giri. 2002. A new distribution record for *Zilchiopsis oronensis* (Miers, 1877) in Argentina. *Crustaceana* 75 (7): 931-934.

Collins, P. A., V. Williner & F. Giri. 2004. Crustáceos decápodos del litoral fluvial argentino, pp. 253-264. En: Aceñolaza, F. G. (ed.) *Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino*. INSUGEO, Miscelánea 12, Tucumán.

Collins, P. A., V. Williner & F. Giri. 2007. Littoral communities. Macrocrustaceans, pp. 277-301. En: Iriondo, M. H., J. C. Paggi & M. J. Parma (eds.) *The middle Paraná river: limnology of a subtropical wetland*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

Conan, G. Y. 1985. Periodicity and phasing of molting, pp. 73-99. En: Wenner, A. M. (ed.) *Factors in adult growth*. A. A. Balkema, Rotterdam/Boston.

Conan, G. Y. & M. Comeau. 1986. Functional maturity and terminal molt of male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 1710-1719.



Conlan, K. E. 1991. Precopulatory mating behavior and sexual dimorphism on the amphipod Crustacea. *Hydrobiologia* 223: 255-282.

Courtney, A. J., S. S. Montgomery, D. J. Die, N. L. Andrew, M. G. Cosgrove & C. Blount. 1995. Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of Eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. *Marine Biology* 122: 547-556.

Cronin, L. E. 1947. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Morphology* 81: 209-239.

Cuartas, E. I., A. C. Díaz & A. M. Petriella. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 15: 5-13.

Cuartas, E. I. & A. M. Petriella. 2010. Estructura del aparato reproductor masculino de *Uca uruguayensis* (Decapoda, Ocypodidae). *Iheringia, Série Zoologia* 100: (1) 59-66.

Cumberlidge, N. 1999. *The freshwater crabs of West Africa*. Family Potamonautidae. Faune et Flore Tropicales 35, Institut de Recherche pour le Développement IRD (ex-ORSTOM), Paris. 382 pp.

Darim, M. F., F. S. David, T. M. Dovanso & F. G. Taddei. 2007. Madureza morfológica do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Decapoda: Brachyura: Trichodactylidae) encontrado na represa Barra de Furnas, Marimbondo, ICÉM – SP. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu-MG.

Desantis, S., M. Labate, F. Cirillo, G. M. Labate, P. Maiorano & G. D'Onghia. 2003. Testicular activity and sperm glycoproteins in giant red



shrimp *Aristaeomorpha foliacea*. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 31: 205-212.

Dhainaut, A. & M. De Leersnyder. 1976. Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire du crabe *Eriocher sinensis*. I. Ovogenèse naturelle. *Archives of Biology* 87: 261-282.

Díaz, A. C., A. M. Petriella & J. L. Fenucci. 2003. Molting cycle and reproduction in the population of the shimp *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Penaeoidea) from Mar del Plata. *Ciencias Marinas* 29 (3): 343-355.

Diesel, R. 1989. Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): observations on sperm transfer, sperm storage and spawning. *Journal of Crustacean Biology* 9: 266-277.

Diesel, R. 1991. Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae), pp. 145-165. En: Bauer, R. T. & J. W. Martin (eds.) *Crustacean sexual biology*. Columbia University, New York.

Dingle, H. 1983. Strategies of agonistic behavior in Crustacea, pp. 113-139. En: Rebacha, S. & D. W. Dunham (eds.) *Studies in adaptation: the behavior of higher Crustacea*. Wiley & Sons, New York.

Donaldson, W. E. & A. A. Adams. 1989. Ethogram of behavior with emphasis on mating for the Tanner crab, *Chionoecetes hairdi* Rathbun. *Journal of Crustacean Biology* 9: 37-51.

Drago, E. C. 2007. (Cap. 4) The physical dynamics of the River-Lake floodplain system, pp. 83-122. En: Iriondo M. H., J. C. Paggi & M. J. Parma (eds.) *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.



Du Preez, H. H. & A. Mclachlan. 1984. Biology of three spot swimming crab, *Ovalipes punctatus* (De Hann). III. Reproduction, fecundity and egg development. *Crustaceana* 47 (3): 285-297.

Eastman-Reks, S. B. & M. Fingerman. 1985. In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Journal of Experimental Zoology* 233 (1): 111-116.

Ebert, D. 1994. A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size at maturity in *Daphnia magna*. *Oikos* 69: 309-317.

Edwards, E. 1964. Mating behavior in the European edible crab (*Cancer pagurus* L.). *Crustaceana* 10: 23-30.

Elner, R. W. & P. G. Beninger. 1995. Multiple reproductive strategies in snow crab, *Chionoecetes opilio*: physiological pathways and behavioral plasticity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193: 93-112.

Elner, R. W., S. Koshio & G. V. Hurley. 1987. Mating behavior of the deep-sea red crab, *Geryon quinquedens* Smith (Decapoda, Brachyura, Geryonidae). *Crustaceana* 52: 194-201.

Elorza, A. & E. Dupre. 2000. Ovary architecture of the Juan Fernández spiny rock lobster, *Jasus frontalis*. *Investigaciones Marinas* 28: 175-194.

Erkan, M., Y. Tunalı, H. Balkis & E. Oliveira. 2009. Morphology of testis and vas deferens in the xanthoid crab, *Eriphia verrucosa* (Forskål, 1775) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology* 29: 458-465.

Faria de Oliveira, C. C. & M. H. Arruda-Leme. 2004. Desenvolvimento embrionário e fecundidade do caranguejo *Armases*



rubripes (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) de uma região esturina de Ubatuba – SP. *Revista Biociências* (Taubaté) 10 (3): 129-137.

Fernández, M., C. Bock & H. Pörtner. 2000. The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. *Ecology Letters* 3: 487-494.

Fernández, M. & A. Brante. 2003. Brood care in brachyuran crabs: the effect of oxygen provision on reproductive costs. *Revista Chilena de Historia Natural* 76 (2): 157-168.

Fielder, D. R. & A. J. Eales. 1972. Observations on courtship, mating and sexual maturity in *Portunus pelagicus* (L., 1766) (Crustacea, Portunidae). *Journal of Natural History* 6: 273-277.

Figler M. H., H. M. Cheverton & G. S. Blank. 1999. Shelter competition in juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): the influences of sex differences, relative size and prior residence. *Aquaculture* 178: 63-75.

Fletcher N. & J. D. Hardege. 2009. The cost of conflict: agonistic encounters influence responses to chemical signals in the European shore crab. *Animal Behaviour* 77: 357-361.

Francis, R. C. 1988. On the relationship between aggression and social dominance. *Ethology* 78: 223-237.

Garcia, T. M. & J. R. F. Silva. 2006. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49 (2): 339-345.

Garvey, J. & R. A. Stein. 1993. Evaluation how chela size influences the invasion potential of an introduce crayfish (*Orconectes rusticus*). *American Natural* 129: 172-181.



Gherardi, F., S. Guidi & M. Vannini. 1987. Behavioural ecology of the freshwater crab, *Potamon fluviatile*: preliminary observations. *Investigación Pesquera* 51 (Supl. 1): 389-402.

Gherardi, F. & F. Micheli. 1989. Population structure and relative growth of *Potamon potamios* in the Dead Sea area. *Israel Journal of Zoology* 36: 133-145.

Gherardi, F., F. Micheli, F. Monaci & F. Tarducci. 1988. Note sulla biologia ed ecologia del granchio di fiume *Potamon fluviatile*. *Bollettino del Museo di Storia Naturale della Lunigiana* 6 (7): 169-174.

Gherardi, F. & M. Vannini. 1989. Field observations on activity and clustering in two intertidal hermit crabs, *Clibanarius virescens* and *Calcinus laevimanus* (Decapoda, Anomura). *Marine Behavior & Physiology* 14: 145-159.

Giese, A. C. 1959. Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology* 21: 547-576.

Giese, A. C. & J. S. Pearse. 1974. *Reproduction of marine invertebrates. Vol. 1.* Academic Press, New York. 546 pp.

Glas, P. S., J. D. Green & J. W. Lynn. 1995. Oxidase activity associated with the elevation of the penaeoid shrimp hatching envelope. *Biological Bulletin* 189: 13-21.

Gleeson, R. A. 1980. Pheromone communication in the reproductive behaviour of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Behaviour and Physiology* 7: 19-134.

Goldstein, M. & E. Dupré. 2010. Sistema reproductivo de hembras y machos en *Cancer setosus* (Molina, 1782) (Decapoda: Brachyura). *Latin American Journal of Aquatic Research* 38 (2): 274-280.



Goudeau, M., F. Lachaise, G. Carpentier & B. Goxe. 1990. High tilers of ecdysteroids are associated with the secretory process of embryonic envelopes in the European lobster. *Tissue Cell* 22: 269-281.

Grant, A. & P. A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocyte size/frequency data, and comparison of different types of data. *International Journal Invertebrate Reproduction* 6: 271-283.

Grassé, P. P. (dir.) 1994. *Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie. Tome VII. Crustacés; fascicule I: Morphologie, Physiologie, Reproduction, Systématique*. Masson et Cie., Paris. 917 pp.

Grassé, P. P., R. A. Poisson & O. Tuzet. 1985. *Zoología. 1. Invertebrados*. Toray-Masson, Barcelona. 938 pp.

Haefner, P. A. & D. H. Spaargaren. 1993. Interactions of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.). I. Weight and volume relationships. *Journal of Crustacean Biology* 13: 523-531.

Haley, S. R. 1984. Ultrastructure of spermatogenesis in the Hawaiian red lobster *Henoplometopus occidentalis* (Randall). *Journal of Morphology* 190: 81-92.

Hammer, O., D. A. T. Harper & P. D. Ryan 2008. PAST-Palaeontological STatistics, version 1.81.

Hartnoll, R. G. 1969. Mating in Brachyura. *Crustaceana* 16: 161-181.

Hartnoll, R. G. 1974. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana* 27 (2): 131-136.



Hartnoll, R. G. 1985. Growth, sexual maturity and reproductive output, pp. 101-128. En: Wenner, A. M. (ed.) *Factors in adult growth*. Crustacean Issues 3. A. A. Balkema, Rotterdam.

Hartnoll, R. G. 1988. Growth and molting. En: Burgreen, W. W. & B. R. McMahon (eds.) *Biology of the Land Crabs*. Cambridge University Press, UK.

Hartnoll, R. G. & P. Gould. 1988. Brachyuran life history strategies and the optimization of egg production. *Symposium of the Zoological Society of London* 59: 1-9.

Hazlett, B., D. Rubenstein & D. Rittschof. 1975. Starvation, energy reserves, and aggression in the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 28: 11-16.

Hebling, N. J. & P. J. Rieger. 2003. Desenvolvimento juvenile de *Hepatus pudibundus* (Herbst) (Crustacea, Decapoda, Calappidae), em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 20 (3): 531-539.

Hernández-Bové, P. 2001. Producción y rendimiento reproductivo en *Petrolisthes granulatus* (Decapoda, Anomura, Porcellanidae) en diferentes localidades del norte de Chile: Una comparación latitudinal. *Investigaciones Marinas* 29 (1): 73-81.

Hines, A. H. 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine Biology* 69: 309-320.

Hines, A. H. 1986. Larval patterns in the life histories of brachyuran crabs. (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Bulletin of Marine Science* 39: 444-466.

Hines, A. H., R. N. Lipcius & M. Haddon. 1987. Population dynamics and habitat partitioning by size, sex, and molt stage of blue



crabs *Callinectes sapidus* in a sub-estuary of central Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series* 36: 55-64.

Hines, A. H., P. R. Jivoff, P. J. Bushmann, J. Van Montfrans, S. A. Reed, D. L. Wolcott & T. G. Wolcott. 2003. Evidence for sperm limitation in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science* 72: 283-310.

Hinsch, G. W. 1988. Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab *Geryon fenneri* from the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Crustacean Biology* 8 (2): 254-261.

Hinsch, G. W. & C. E. McKnight. 1988. The vas deferens of the Spanish lobster, *Scyllarus chacei*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 13: 267-280.

Hinsch, G. W. & M. H. Walker. 1974. The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *Journal of Morphology* 143 (1): 1-19.

Huber, M. E. 1985. Allometric growth of the carapace in *Trapezia* (Brachyura, Xanthidae). *Journal of Crustacean Biology* 5: 79-83.

Huber, M. E. 1987. Aggressive-behavior of *Trapezia intermedia* miers and *Trapezia-digitalis latreille* (Brachyura, Xanthidae). *Journal of Crustacean Biology* 7: 238-248.

Huntingford, F. A., A. C. Taylor, I. P. Smith & K. E. Thorpe. 1995. Behavioural and physiological studies of aggression in swimming crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193 (1-2): 21-39.

Icely, J. D. & J. A. Nott. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs, pp. 147-201. En: Harrison, F. W. & A. G. Humes (eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates. Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, New York.



Ingle, R. W. & W. Thomas. 1974. Mating and spawning of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Crustacea, Astacidae). *Journal of Zoology* 173: 525-538.

Iriondo, M. 2007. Geomorphology (Cap. 2). En: Iriondo, M., J. C. Paggi & M. J. Parma (eds.) *The Middle Paraná River: Limnology of a Subtropical Wetland*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ituarte, R. B., C. Bas, T. A. Luppi & E. D. Spivak. 2006. Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina* 70: 709-718.

Ituarte, R. B., E. D. Spivak & T. A. Luppi. 2004. Female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Grapsoidea, Varunidae). *Scientia Marina* 68 (1): 127-137

Jalihal, D. R., K. N. Sankolli & S. Shenoy. 1993. Evolution of larval development patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 65: 365-376.

Jivoff, P. 1997. The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 40: 175-185.

Jivoff, P. & A. H. Hines. 1998. Female behavior, sexual competition and mate guarding in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Animal Behaviour* 55: 589-603.

Jivoff, P., A. H. Hines & L. S. Quscknbush. 2007. Reproduction



Biology and Embryonic Development (Chap. 7). En: Kennedy, V. S. & L. E. Cronin (eds.) *The Blue Crab Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant.

Johnson, P. T. 1980. *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus*. Praeger Publishers, New York. 440 pp.

Jones, M. B. & M. J. Simons. 1983. Latitudinal variation in reproductive characteristics of a mud crab, *Helice crassa* (Grapsidae). *Bulletin of Marine Science* 33: 656-670.

Kaestner, A. 1970. *Invertebrate Zoology. Vol. 3. Crustacea*. Interscience Publishers, New York. 523 pp.

King, J. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biological Bulletin* 94: 244-262.

Kooda-Cisco, M. & P. Talbot. 1986. Ultrastructure and role of the lobster vas deferens in spermatophore formation: the proximal segment. *Journal of Morphology* 188: 91-103.

Krol, R. M., W. E. Hawkins & R. M. Overstreet. 1992. Reproductive components, pp. 295-343. En: Harrison, F. W. & A. G. Humes (eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates. Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, New York.

Kronenberger, K., D. Brandis, M. Türkay & V. Storch. 2004. Functional morphology of the reproductive system of *Galathea intermedia* (Decapoda: Anomura). *Journal of Morphology* 262: 500-516.

Kulkarni, G. K., L. Glade & M. Fingerman. 1991. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Journal of Crustacean Biology* 11: 513-521.



Kyomo, J. 1988. Analysis of the relationship between gonads and hepatopancreas in males and females of the crab *Sesarma intermedia*, with reference to resource use and reproduction. *Marine Biology* 97: 87-93.

Lajmanovich, R. C. & A. H. Beltzer. 1993. Aporte al conocimiento de la biología alimentaria de la pollona negra *Gallinula chloropus* en el Paraná medio, Argentina. *El Hornero* 13 (4): 289-291.

Lammers, J. H., K. Warburton & W. C. Bronwen. 2009. Diurnal refuge competition in the freshwater prawn, *Macrobrachium australiense*. *Journal of Crustacean Biology*, 29 (4): 476-483.

Lardies, M. A., I. S. Cotoras & F. Bozinovic. 2004. The energetics of reproduction and parental care in the terrestrial isopod *Porcellio laevis*. *Journal of Insect Physiology* 50: 1127-1135.

Lee, C. Y. & D. Watson. 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 271: 364-372.

Lee, F. Y. & C. F. Chang. 1997. The concentration of vitellogenin (Vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 117: 433-439.

Lee, S. Y. 1995. Cheliped size and structure: the evolution of a multi-functional decapod organ. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193: 161-173.

Légrand, J. J. & P. Juchault. 1994. Ontogenèse du sexe et physiologie sexuelle, pp. 631-715. En: Forest, J. (ed.) *Traité de Zoologie*.



Tome VII, Crustacés, Fascicule 1, Morphologie, Physiologie, Reproduction, Embryologie. Masson et Cie., Paris.

Leme, M. H. 2006. Seasonal changes in reproductive traits of the crab *Sesarma rectum* (Grapsoidea: Sesarmidae) on the Northern coast of São Paulo State, Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 26 (2): 141-147.

Lima, G. V. & L. M. Oshiro. 2006. Maturidade sexual do caranguejo *Armases rubripes* (Rathbun) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae) na Baía de Spetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (4): 1078-1086.

Lipcius, R. N., M. L. Edwards, W. E. Herrnkind & S. L. Waterman. 1983. In situ mating behavior of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology* 3: 217-222.

Litulo, C. 2005. External factors determining the reproductive periodicity in a tropical population of the hairy crab *Pilumnus vespertilio* (Decapoda: Brachyura: Pilumnidae). *Raffles Bulletin of Zoology* 53: 115-118.

Liu, H. C. & C. W. Li. 2000. Reproduction in the fresh-water crab *Candidiopotamon rathbunae* (Brachyura: Potamidae) in Taiwan. *Journal of Crustacean Biology* 20: 89-99.

López-Greco, L. S. 1997. Adquisición de la madurez sexual y caracterización del patrón de crecimiento y reproducción de *Chasmagnathus granulata* Dana (Brachyura, Grapsidae, Sesarminae) de Bahía Samborombón, Buenos Aires, Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires,. 244 pp.

López-Greco, L. S. 2013. Functional anatomy of the reproductive system, pp. 413-450 (Chap. 15). En: Watling, L. & M. Thiel (eds.)



Functional Morphology and Diversity of the Crustaceans. Vol I. Oxford University Press, New York.

López-Greco, L. S. & E. M. Rodríguez. 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine* 40: 155-164.

López-Greco, L. S., V. Viau, M. Lavolpe, G. Bond-Buckup & E. M. Rodríguez. 2004. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglididae). *Journal of Crustacean Biology* 24 (2): 309-313.

Lopretto, E. C. 1976. Morfología comparada de los pleópodos sexuales masculinos en los Trichodactylidae de la Argentina (Decapoda, Brachyura). *Limnobiós* 1 (3): 67-94.

Lopretto, E. C. 1981. Discusión sobre las presuntas subespecies de *Dilocarcinus pagei* (Crustacea Brachyura Trichodactylidae). Redescripción y referencia a su polifenismo. *Physis* B 39 (97): 21-31.

Lopretto, E. C. 1995. Crustacea Eumalacostraca, pp. 1001-1039. En: Lopretto, E. C. & G. Tell (eds.) *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Tomo III.* Ediciones Sur, La Plata, Argentina.

Lynn, J. V. & W. H. Clark, Jr. 1983. A morphological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biological Bulletin* 164: 446-458.

Lynn, J. W., P. S. Glas, Q. Lin & J. D. Green. 1993. Assembly of extracellular envelopes around the eggs and embryos of the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Journal of Reproduction and Development* 39: 90-91.



MacArthur, R. H. & E. O. Wilson. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.

Maina, J. N. 1990. The morphology of the gills of the freshwater African crab *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachyura: Potamidae): A scanning and transmission electron microscopic study. *Journal of Zoology* 221: 499-515.

Magalhães, C. V. F. 1991. Revisão Taxonômica dos Caranguejos Dulcícolas da Família Trichodactylidae. (Crustacea: Decapoda: Brachyura). 1991, 175 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Usp – Instituto de Biociências.

Magalhães, C. 2003. Famílias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae, pp. 143-287. En: Melo, G. A. S. (ed.) *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. Edições Loyola, São Paulo.

Magalhães, C. & M. Türkay. 1996a. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae I. The generic system with description of some new genera (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biologica* 75 (1/2): 63-95.

Magalhães, C. & M. Türkay. 1996b. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae II. The genera *Forsteria*, *Melocarcinus*, *Sylviocarcinus*, and *Zilchiopsis* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biologica* 75 (1/2): 97-130.

Magalhães, C. & M. Türkay. 1996c. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae III. The genera *Fredilocarcinus* and *Goyazana* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biologica* 75 (1/2): 131-142.

Magalhães, C. & M. Türkay. 2008a. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae, IV. The genera *Dilocarcinus*



and Poppiana (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biológica*, 88 (2): 185-215.

Magalhães, C. & M. Türkay. 2008b. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae, V. The genera *Bottiella* and *Rotundovaldivia* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biologica* 88 (2): 217-230.

Manning, R. B. & H. H. Hobbs. 1977. Decapoda, pp. 157-162. En: Hurlbert, H. (ed.) *Biota acuática de Sudamérica austral*. San Diego State University, San Diego, California.

Mansur, C. B. & N. J. Hebling. 2002. Análise comparativa entre a fecundidade de *Dilocarcinus pagei* Stimpson e *Sylviocarcinus australis* Magalhães & Türkay (Crustacea, Decapoda, Trichodactylidae) no Pantanal do Rio Paraguai, Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Zoologia* 19 (3): 797-805.

Mansur, C. B., N. J. Hebling & J. A. de Souza. 2005. Crescimento relativo de *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 e *Sylviocarcinus australis* Magalhães e Türkay, 1996 (Decapoda: Trichodactylidae) no Pantanal do Rio Paraguai, Porto Murtinho - Mato Grosso do Sul. *Boletim do Instituto de Pesca* (São Paulo) 31 (2): 103-107.

Martin, J. W. & G. E. Davis. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County, *Science Series* 39: 1-124.

Mason, J. C. 1970. Copulatory behavior of crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson). *Canadian Journal of Zoology* 48: 969-976.

Massoia, E. 1976. Mammalia. En: Ringuelet, R. A. (dir.) *Fauna de*



agua dulce de la República Argentina. FECIC (CONICET), Buenos Aires. 128 pp.

McLaughlin, P. A. 1983. *Comparative morphology of recent Crustacea*. W. H. Freeman, New York. 177 pp.

McLay, C. L. & L. S. López-Greco. 2011. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? *Zoologischer Anzeiger* 250: 378-406.

Melo, G. A. S. 1967. Diferenciação Geográfica e Dimorfismo Sexual de *Trichodactylus fluviatilis* (Trichodactylus) Latreille, 1828 (Crustacea, Brachyura). *Papéis Avulsos de Zoologia* 20 (3): 13-44.

Melo, G. A. S. 2003. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. Edições Loyola, São Paulo. 429 pp.

Meusy, J. J. 1980. Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in crustacea: a review. *Reproduction Nutritional Development* 20 (1A): 1-21.

Meusy, J. J. & H. Charniaux-Cotton. 1984. Endocrine control of vitellogenesis in malacostraca crustaceans. *Advances in Invertebrates Reproduction* 3: 231-241.

Meusy, J. J. & G. G. Payen. 1988. Female reproduction in malacostracan Crustacea. *Zoological Science* 5: 217-265.

Micheli, F., F. Gherardi & M. Vannini. 1990. Growth and reproduction in the freshwater crab *Potamon fluviatile* Herbst (Decapoda, Brachyura). *Freshwater Biology* 23: 491-503.



Micheli, F., F. Gherardi & M. Vannini. 1991. Feeding and burrowing ecology of two East African mangrove crabs. *Marine Biology* 111: 247-254.

Minei, H. 1976. Ecology of the freshwater crab, *Geothelphusa dehaani*. *Anima* 41: 10-15.

Moriyasu, M., K. Benhalima, D. Duggan, P. Lawton & D. Robichaud. 2002. Reproductive biology of male jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson, 1859 (Decapoda, Cancridae) on the Scotian shelf, northwestern Atlantic. *Crustaceana* 75 (7): 891-913.

Moore, P. A. 2007. Agonistic behavior in freshwater crayfish – the influence of intrinsic and extrinsic factors on aggressive encounters and dominance, pp. 90-114. En: Duffy, E. J. & M. Thiel (eds.) *Evolutionary ecology of social and sexual systems – crustaceans as model organisms*. Harvard University Press, New York.

Morrone J. J. & E. C. Lopretto. 1994. Distributional patterns of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in southern South America: a panbiogeographic approach. *Journal of Biogeography* 21: 97-109.

Morrone, J. J. & E. C. Lopretto. 1996. Cladistics of the family Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda): A reappraisal. *Journal of Comparative Biology* 1 (1/2): 65-72.

Morrone, J. J. & E. C. Lopretto. 1997. Cladistics of the freshwater crab family Trichodactylidae. Reply to von Sternberg. *Journal of Comparative Biology* 2 (1): 63-64.

Morrone, J. J. & E. C. Lopretto. 2001. Trichodactylid biogeographic patterns (Crustacea: Decapoda) and the Neotropical region. *Neotrópica* 47: 49-55.



Mourente, G. & A. Rodríguez. 1991. Variation in the lipid contents of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biology* 110: 21-28.

Nagao, J. & H. Munehara. 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *The Open Fish Science Journal* 69: 1200-1208.

Nakashima, Y. 1995. Can small male shrimps achieve copulation in the presence of larger ones? *Journal of Ethology* 13: 9-16.

Navas, J. 1991. Aves Gruiformes. En: Ageitos de Castellanos, Z. (dir.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 43 (3). PROFADU (CONICET), Buenos Aires. 80 pp.

Navas, J. 1993. Aves Podicipediformes y Pelecaniformes. En: Ageitos de Castellanos, Z. (ed.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 43 (1A). PROFADU (CONICET), Buenos Aires. 79 pp.

Navas, J. 1995. Aves Ciconiiformes. En: Ageitos de Castellanos, Z. (ed.) *Fauna de agua dulce de la República Argentina* 43 (1C). PROFADU (CONICET), Buenos Aires. 53 pp.

Negreiros-Fransozo. M. L., A. Fransozo, F. L. M. Mantelatto, J. M. Nakagaki & M. C. F. Spilborghs. 1992. Fecundity of *Paguristes tortugae* Schmitt, 1933 (Crustacea, Decapoda, Anomura) in Ubatuba (SP), Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 52 (4): 547-553.

Ng, P. K. L. & C. G. S. Tan. 1995. *Geosesarma notophorum* sp. nov. (Decapoda, Brachyura, Grapsidae, Sesarmidae) a terrestrial crab from Sumatra, with novel brooding behavior. *Crustaceana* 68: 390-395.

Odinetz-Collart, O. & H. Rabelo. 1996. Variation in egg size of the fresh-water prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 16 (4): 684-688.



Okumura, T. & M. Hara. 2004. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological Science* 21: 621-628.

Oliveira de Moura, N. F. & P. A. Coelho. 2004. Maturidade sexual fisiológica em *Goniopsis cruentata* (Latreille) (Crustacea, Brachyura, Grapsidae) no Estuário do Paripe, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (4): 1011-1015.

Omori, M. 1974. The biology of pelagic shrimps in the oceans. *Advances in Marine Biology* 12: 233-324.

Parker, G. A. 1974. Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *Journal of Theoretical Biology* 47: 223-243.

Peeke, H. V. S., J. Sippel & M. H. Figler. 1995. Prior residence effects in shelter defense in adult signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) - results in same-sex and mixed-sex dyads. *Crustaceana* 68: 873-881.

Pérez, C. 1928. Sur l'appareil d'accrochage de l'abdomen au thorax chez les Décapodes Bachyours. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 186: 461-463.

Perez, O. S. 1990. Reproductive biology of the sandy shore crab *Matuta lunaris* (Brachyura: Calappidae). *Marine Ecology Progress Series* 59: 83-89.

Perez, O. S. & D. R. Bellwood. 1989. Observations on the mating behaviour of the Indo-Pacific sandy shore crab *Matuta htnaris* (Forskal) with notes on the reproductive behaviour of the Matutinae (Decapoda, Brachyura, Calappidae). *Crustaceana* 57:1-9.



Pianka, E. R. 1970. On r and K-selection. *American Naturalist* 104: 592-597.

Pillai, C. K. & T. Subramoniam. 1984. Monsoon-dependent breeding in the field crab *Paratelphusa hydrodromus* (Herbst). *Hydrobiologia* 119 (1): 7-14.

Pillay, K. K. & N. B. Nair. 1973. Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. *Marine Biology* 18: 167-198.

Pinheiro, M. A. A. & A. Fransozo. 1995. Fecundidade de *Pachycheles haigae* Rodrigues da Costa, 1960 (Crustacea, Anomura, Porcellanidae) em Ubatuba (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 55 (4): 623-631.

Pinheiro, M. A. A. & A. Fransozo. 2002. Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23°30 S. *Journal of Crustacean Biology* 23: 416-428.

Pinheiro, M. A. A. & F. G. Taddei. 2005. Crescimento do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Crustacea, Brachyura, Trichodactylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (3): 522-528.

Pochon-Masson, J. 1994. Les gamétogenèses, pp. 727-783. En: Forest, J. (ed.) *Traité de Zoologie, Tome VII, Crustacés, Fascicule 1, Morphologie, physiologie, reproduction, embryologie*. Masson et Cie., Paris.

Prenter J., R. W. Elwood & P. W. Taylor. 2006. Self-assessment by males during energetically costly contests over precopula females in amphipods. *Animal Behaviour* 72: 861-868.



Rabalais, N. N. 1991. Egg production in crabs with abbreviated development, pp. 217-234. En: Wenner, A. & A. Kuris (eds.) *Crustacean Egg Production*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.

Ranta, E., V. Kaitala & P. Lundberg. 1998. Population variability in space and time: dynamics of synchronous population fluctuations. *Oikos* 83: 376-382.

Raven, C. P. 1961 *Oogenesis: the storage of developmental information*. Pergamon Press, Oxford. 274 pp.

Renzulli, P. & P. A. Collins. 2000. Influencia de la temperatura en el crecimiento del cangrejo *Trichodactylus borellianus*. FABICIB 4: 129-136.

Renzulli, P. & P. A. Collins. 2001. Ritmo nictimeral de la actividad locomotora de los cangrejos dulciacuicolas *Dilocarcinus pagei pagei* Simpson, 1861 y *Trichodactylus borellianus* Nobili, 1896. FABICIB 5: 145-153.

Rodríguez, E. M. 1991. Efectos letales y subletales de dos plaguicidas sobre las especies *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (cangrejal bonaerense). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires., Argentina. 219 pp.

Rodríguez, G. 1980. *Los crustáceos decápodos de Venezuela*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela. 444 pp.

Rodríguez, G. 1981. Decapoda, pp. 41-51. En: Hurlbert, S. H., G. Rodríguez & N. D. Dos Santos (eds.) *Aquatic biota of tropical South America. Part I: Arthropoda*. San Diego State University, San Diego, California.



Rodríguez, G. 1992. *The freshwater crabs of America*. Family Trichodactylidae and supplement to the family Pseudothelphusidae. ORSTOM Faune Tropicale 31, París. 189 pp.

Rodrigues, W. & N. J. Hebling. 1978. Estudos biológicos em *Aegla perobae* Hebling & Rodrigues, 1977 (Decapoda, Anomura). *Revista Brasileira de Biologia* 38: 383-390.

Rodríguez-González, H., A. Hernández-Llamas, H. Villareal, P. Saucedo, M. García-Ulloa & C. Rodríguez-Jaramillo. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the gonadosomatic index at first maturation. *Aquaculture* 254: 637-645.

Romero, L. 2003. Comportamiento reproductivo y mutilaciones en el cangrejo de las rocas *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Decapoda). *Revista Peruana de Biología* 10: 2-10.

Rosa, R. A. & M. L. Nunes. 2003. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. *Crustaceana* 75: 1095-1105.

Ruetz, C. R., J. C. Trexler, F. Jordan, W. F. Loftus & S. A. Perry. 2005. Population dynamics of wetland fishes: spatio-temporal patterns synchronized by hydrological disturbance? *Journal of Animal Ecology* 74: 322-332.

Ruiz, A. E. & L. F. Mencia. 2008. Observaciones morfométricas y reproductivas en el langostino *Pleoticus muelleri* Bate, 1888 procedente de embarcaciones comerciales del puerto Rawson, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43 (3): 675-680.



Rutherford, P. L., D. W. Dunham & V. Allison. 1995. Winning agonistic encounters by male crayfish *Orconectes rusticus* (Girard) (Decapoda, Cambaridae): chela size matters but chela symmetry does not. *Crustaceana* 68: 526-529.

Ryan, E. P. 1966. Pheromone: evidence in a decapod crustacean. *Science* 151: 340-341.

Ryan, E. P. 1967. Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae) II. The female system. *Proceedings of the Symposium on Crustacea, Marine Biology Association India Ernakulam* 2: 522-544.

Sainte-Marie, G. & B. Sainte-Marie. 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. *Canadian Journal of Zoology* 77 (3): 440-450.

Sainte-Marie, G. & B. Sainte-Marie. 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). II. Multiple types of sperm cells and of spermatophores in the spermathecae of mated females. *Canadian Journal of Zoology* 77 (3): 451-462.

Sampedro, M. P., L. Fernández, J. Freire & E. González-Gurriarán. 1997. Fecundity and reproductive output of *Pisidia longicornis* (Decapoda, Anomura) in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Crustaceana* 70 (1): 95-109.

Sandifer, P. A. & J. W. Lynn. 1980. Artificial insemination of caridean shrimp, pp. 271-288. En: Clark, W. H. Jr. & T. S. Adams (eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction, Vol. II*. Elsevier, North Holland, New York.



Santhoshi, S., V. Sugumar & N. Munuswamy. 2009. Serotonergic stimulation of ovarian maturation and hemolymph vitellogenin in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 291: 192-199.

Sastry, A. N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biological Bulletin* 130: 118-134.

Sastry, A. N. 1970. Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biological Bulletin* 138: 56-65.

Sastry, A. N. 1983. Ecological aspects of reproduction, pp. 179-270. En: Vernberg, F. J. & W. B. Vernberg (eds.) *The Biology of Crustacea. Environmental Adaptations*. Academic Press, New York.

Schaefer, E. F. 2007. Restricciones cuantitativas asociadas con los modos reproductivos de los anfibios en áreas de impacto por la actividad arroceras en la provincia de Corrientes. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

Schram, F. R. 1986. *Crustacea*. Oxford University Press, New York. 606 pp.

Schroeder, L. & R. Huber. 2001. Fight strategies differ with size and allometric growth of claws crayfish, *Orconectes rusticus*. *Behaviour* 138: 1437-1449.

Seibt, U. & W. Wickler. 1979. The biological significance of the pair-bond in the shrimp *Hymenocera picta*. *ZierTierpsychology* 50: 166-179.

Shigekawa, K. & W. H. Clark Jr. 1986. Spermiogenesis in the



marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Development Growth and Differentiation* 28: 95-112.

Simeo, C. G., E. Ribes & G. Rotlant. 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell* 41: 345-361.

Snedden, W. A. 1990. Determinants of male mating success in the temperate crayfish *Orconectes rusticus*: chela size and sperm competition. *Behaviour* 115: 100-113.

Sokolowicz, C. C., G. Bond-Buckup, & L. Buckup. 2006. Dynamics of gonadal development of *Aegla platensis* Schmitt (Decapoda, Anomura, Aeglididae). *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 1153-1158.

Sokolowicz, C. C., L. A. Peres & S. Santos. 2007. Atividade nictimeral e tempo de digestão de *Aegla longirostris* (Crustacea, Decapoda). *Iheringia, Série Zoologia* 97: 235-238.

Souty-Grosset, C. 1997. Vitellogenin synthesis in marine invertebrates, pp. 203-247. En: Fingerman, M., R. Nagabhushanam & M. Thompson (eds.) *Recent Advances in Marine Biotechnology, Endocrinology and Reproduction*. Science Publishers, New Hampshire.

Souza da Silva, L. 2010. Estrutura populacional e maturidade sexual de *Sylviocarcinus pictus* (H. Milne-Edwards, 1853) e *S. devillei* H. Milne-Edwards, 1853 (Brachyura, Trichodactylidae) das ilhas do estuário amazônico no entorno de Belém, Pará, Brasil. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca.

Spaargaren, D. H. & P. A. Haefner. 1994. Interactions of ovary and



hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L.).
II. Biochemical relationships. *Journal of Crustacean Biology* 14: 6-19.

Steele, P. & T. M. Bert. 1994. Population ecology of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, in a subtropical estuary: population structure, aspects of reproduction and habitat partitioning. *Florida Marine Research Publication* 51: 1-24.

Stein, R. A. 1976. Sexual dimorphism in crayfish chelae: functional significance linked to reproductive activities. *Canadian Journal of Zoology* 54: 220-227.

Sternberg, R. v. 1997. Cladistics of the freshwater crab family Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda): appraising the reappraisal. *Journal of Comparative Biology* 2 (1): 49-62.

Sternberg, R. v. 1998. The sister group of the freshwater crab family Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda: Eubrachyura). *Journal of Comparative Biology* 3: 93-101.

Števcíć, Z. 1971. The main features of brachyuran evolution. *Systematic Zoology* 20: 331-340.

Stewart, M. J., P. Stewart, N. Soonklang, V. Linthong, P. J. Hanna, W. Duan & P. Sobhon. 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell* 42: 137-150.

Stocker, A. M. & R. Huber. 2001. Fighting strategies in crayfish *Orconectes rusticus* (Decapoda: Cambaridae) differ with hunger state and the presence of food cues. *Ethology* 107: 727-736.

Subramoniam, T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans, pp. 290-307. En: Bauer, R. T. & J. W. Martin (eds.) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York.



Subramoniam, T. 1993. Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans, pp. 129-214. En: Blaxter, J. H. S. & A. J. Southward (eds.) *Advances in Marine Biology*. Academic Press, New York.

Swiech-Ayoub, B. P. & S. Masunari. 2001. Flutuações temporal e espacial de abundância e composição de tamanho de *Aegla castro* Schmitt (Crustacea, Anomura, Aeglidae) no Buraco do Padre, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18 (3): 1003-1017.

Taddei, F. G. 1999. Biologia populacional e crescimento do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Crustacea, Brachyura, Trichodactylidae) da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 107 pp.

Talbot, P. & M. Goudeau. 1988. A complex cortical reaction leads to formation of the fertilization envelope in the lobster, *Homarus*. *Gamete Research* 19: 1-18.

Talbot, P. & R. G. Summers. 1978. The structure of the sperm of *Panulirus*, the spiny lobster, with special regards to the acrosome. *Journal of Ultrastructure Research* 64: 341-351.

Taylor, H. H. & N. Leelapiyanart. 2001. Oxygen uptake by embryos and ovigerous females of two intertidal crabs, *Heterozius rotundifrons* (Bellidae) and *Cyclograpsus lavauxi* (Grapsidae): scaling and the metabolic costs of reproduction. *Journal of Experimental Biology* 204 (6): 1083-1097.

Teshima, S. & A. Kanazawa. 1983. Variation in lipid composition during ovarian maturation of the prawn. *Bulletin Japanese Society Science Fisheries* 49: 957-962.



Teytaud, A. R. 1971. The laboratory studies of sex recognition in the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun). *University of Miami Sea Grant Report* 15: 1-63.

Thiel, M. 1999. Duration of extended parental care in marine amphipods. *Journal of Crustacean Biology* 19: 60-71.

Thiel, M. 2003. Extended parental care in crustaceans, an update. *Revista Chilena de Historia Natural* 76 (2): 205-218.

Tiu, S. H. K., J. H. L. Hui, A. S. C. Mak, J. G. He & S. M. Chan. 2006. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 254: 666-674.

Tom, M., M. Goren & M. Ovadia. 1987. Localization of vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris*. *Invertebrate Reproduction & Development* 12: 1-12.

Tseng, D. Y., Y. N. Chen, G. Koua, C. F. Loa & C. M. Kuo. 2001. Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 129: 909-917.

Tsukimura, B. 2001. Crustacean vitellogenesis: Its role in oocyte development. *American Zoologist* 41: 465-476.

Tudge, C. C., B. G. M. Jamieson, L. Sandberg & C. Erséus. 1998. Ultrastructure of the mature spermatozoon of the king crab *Lithodes maja* (Lithodidae, Anomura, Decapoda): further confirmation of a lithodid-pagurid relationship. *Invertebrate Biology* 117 (1): 57-66.

Tuset, V. M., D. Espinosa, A. García-Mederosa, J. I. Santana & J. A. González. 2011. Egg development and fecundity estimation in deep-



sea red crab, *Chaceon affinis* (Geryonidae), off the Canary Islands (NE Atlantic). *Fisheries Research* 109 (2): 373-378.

Uma, K. & T. Subramonian. 1979. Histochemical characteristics of spermatophore layer of *Scylla serrata* (Forskål) (Decapoda: Portunidae). *International Journal of Invertebrate Reproduction* 1: 31-40.

Van Herp, F. 1993. Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example. *Journal of Marine Biotechnology* 1: 17-20.

Vázquez, F. J., C. Tropea, & L. S. López-Greco. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). *Invertebrate Biology* 127 (4): 433-443.

Vazquez-Boucard, C. G., H. J. Ceccaldi, Y. Benyamin & C. Roustan. 1986. Identification, purification et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode natantia *Penaeus japonicus* (Bate). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 97 (1): 37-50.

Vazzoler, A. E. A. De M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, SBI, Editora Universidade Estadual de Maringá. 169 pp.

Vieira et al. (2013). Juvenile development of *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Brachyura, Trichodactylidae) reared in the laboratory, with emphasis on setae morphology. *Crustaceana*, 86 (13-14): 1644-1663.

Volpato, G. L. & K. Hoshino. 1984. Adaptative process derived from the agonistic behavior in the freshwater prawn *Macrobrachium iheringii* (Ortmann, 1897). *Boletim de Fisiologia Animal* 8: 157-163.



Waddy, S. L. & D. E. Aiken. 1991. Mating and insemination in the American lobster, *Homarus americanus*, pp. 126-144. En: Bauer, R. T. & J. W. Martin (eds.) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York.

Wainwright, G. & H. H. Rees. 2001. Hormonal regulation of reproductive development in crustaceans, pp. 71-84. En: Atkinson, D. & M. Thorndyke (eds.) *Environment and Animal Development*. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford.

Warner, G. F. 1977. *The Biology of Crabs*. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 129 pp.

Warren, A. H., L. Saltzman, M. A. Buckholt & L. M. Mathews. 2009. Agonistic interactions differ by sex and season in the crayfish *Orconectes quinebaugensis*. *Journal of Crustacean Biology* 29 (4): 484-490.

Wasson, K., B. E. Lyon & M. Knope. 2002. Hair-trigger autotomy in porcelain crabs is a highly effective escape strategy. *Behaviour Ecology* 13: 481-486.

Wehrtmann, I. S., C. Magalhães, P. Hernáez, P. & F. L. Mantelatto. 2010. Production of eggs and juveniles in three freshwater crab species (Brachyura: Pseudothelphusidae) from Amazon region and Central America. *Zoologia* 27 (6): 965-972.

Wilder, M. N., T. Okumura & N. Tsutsui. 2010. Reproductive mechanisms in Crustacea focusing on selected prawn species: Vitellogenin structure, processing and synthetic control. *Aqua-BioScience Monographs* 3 (3): 73-110.

Williner, V. & P. A. Collins. 2002. Daily rhythm of feeding activity of freshwater crab *Dilocarcinus pagei pagei* in National Park Río



Pilcomayo, Formosa, Argentina, pp. 171-178. En: Escobar-Briones, E. & F. Álvarez (eds.) *Modern approaches to the study of Crustacea*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Williner, V. & P. A. Collins. 2003. Effects of cypermethrin upon the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71 (1): 106-113.

Wilson, E. O. 1975. *Sociobiology: The New Synthesis*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 701 pp.

Wunderlich, A. C., M. A. A. Pinheiro & A. M. T. Rodrigues. 2008. Biologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), na Baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 25 (2): 188-198.

Yamaguchi, T. 2001. Seasonal change of the hepatopancreas index in the males of the fiddler crab, *Uca lactea*. *Crustaceana* 4 (7): 627-634.

Yang, F., H. T. Xu, Z. M. Dai & W. J. Yang. 2005. Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 142: 456-464.

Yeo, D. C. J., P. K. L. Ng, N. Cumberlidge, C. Magalhães, S. R. Daniels & M. R. Campos. 2008. Global diversity of crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 275-286.

Yosho, I. 2000. Reproductive cycle and fecundity of *Chionoecetes japonicus* (Brachyura: Majidae) off the coast of Central Honshu, Sea of Japan. *Fisheries Science* (5) 66: 940-946.

Zar, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis. 3rd edition*. Prentice Hall, New Jersey, USA. 662 pp.



Zara, F. J., M. H. Toyama, F. H. Caetano & L. S. López-Greco. 2012. Spermatogenesis, spermatophore and seminal fluid production in the blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology* 32: 249-262.

Zimmermann, B. L., A. W. Aued, S. Machado, D. Manfio, L. P. Scarton & S. Santos. 2009. Behavioural repertory of *Trichodactylus panoplus* (Crustacea: Trichodactylidae) under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Zoologia* 26: 5-11.

Zulandt-Schneider, R. A., R. Huber & P. A. Moore. 2001. Individual and status recognition in the crayfish, *Orconectes rusticus*: The effects of urine release on fight dynamics. *Behaviour* 138: 137-153.

Zulandt-Schneider, R. A., R. W. S. Schneider & P. A. Moore. 1999. Recognition of dominance status by chemoreception in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of Chemical Ecology* 25: 781-794.



La información referida a la reproducción de los cangrejos tricodactílicos obtenida en esta tesis se espera sea el primer peldaño de una serie de investigaciones sobre la reproducción de estos maravillosos animales de los cuales hay mucho que aprender.

